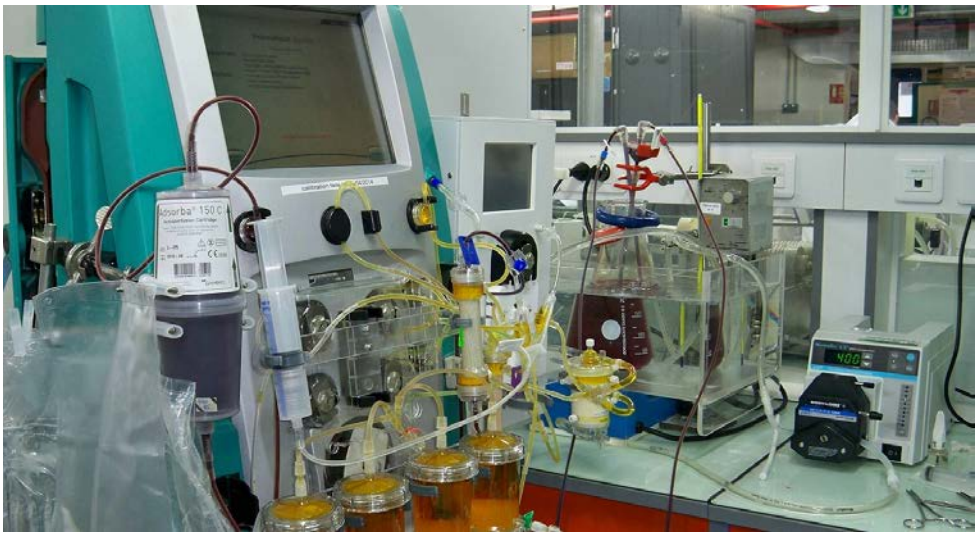
Intégration d'un bioréacteur à lit fluidisé dans un circuit extracorporel monitoré

Sarah Figaro

Par **Sarah FIGARO**

Intégration d'un bioréacteur à lit fluidise dans un circuit extracorporel monitoré

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'UTC



Soutenue le 30 juin 2015
Spécialité : Biomécanique et Bioingénierie

D2202

Mémoire de thèse

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

Laboratoire : Biomécanique et Bioingénierie

Thèse soutenue le 30 juin 2015

SARAH FIGARO

INTEGRATION D'UN BIOREACTEUR A LIT FLUIDISE DANS UN CIRCUIT EXTRACORPOREL MONITORE

Thèse dirigée par Cécile LEGALLAIS, George VANTARD, et Dominique POUCHOULIN

Membres du jury :

Rapporteurs : SCATTON O., Pr, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Pris

RIEU R., Pr, POLYTECH Marseille

Examinateurs : DUBART-KUPPERSCHMITT A., DR INSERM U1193, Villejuif

EGLES C., Pr, Université de Technologie de Compiègne

LEGALLAIS C., DR, Université de Technologie de Compiègne

POUCHOULIN D., Dr, Gambro Industries Meyzieu

“La science dit : "Nous devons vivre" et cherche le moyen de prolonger, approfondir, faciliter et amplifier la vie, de la rendre tolérable et acceptable. La sagesse dit : " Nous devons mourir" et cherche comment nous faire bien mourir.”

De Miguel de Unamuno, poète, romancier et philosophe espagnol, 1864-1936

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes différents directeurs de thèse, Cécile Legallais et Georges Vantard puis Dominique Pouchoulin, qui m'ont donné l'opportunité de faire ce doctorat et m'ont accompagnée tout au long de son déroulement.

Je voudrais ensuite remercier Olivier Scatton et Régis Rieu d'avoir consenti à relire mon manuscrit en tant que rapporteurs. Je remercie aussi Anne Dubart-Kupperschmitt et Christophe Egles pour avoir accepté d'être présents lors de ma soutenance afin de juger mon travail.

Je souhaite grandement remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à produire les résultats présentés dans ce manuscrit. : Ulysse Pereira pour tous les aspects liés à la culture cellulaire, Marie José Fleury pour avoir réalisé une grande partie des tests biologiques, Hiram Rada, Nicolas Semenzato et Achille Fouilleul pour m'avoir aidée à créer et à valider la circulation extracorporelle et mes étudiants ingénieurs, Xuan Luo, Clémence Vigouroux, Solenne Vaillant, et Kévin Blaize, qui ont travaillé sur certains aspects liés à la fluidisation et l'oxygénation.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée pour tout un tas de petites choses sans lesquelles ce doctorat ne se serait pas aussi bien déroulé scientifiquement et humainement parlant:

A l'Université de Technologie de Compiègne : Vittoria Pandofli, Murielle Dufresne, Patrick Paullier, Timothée Baudequin, Thibault Bricks, Rachid Jellali …

A Gambro : Eric Roussi, Marie Clerc, Alain Frugier, Stephane Desmars, Thierry Crost, Fabienne Rutz, Marie Alice Teixeira, Guirec Herve…

Je remercie enfin mon conjoint, ma famille, et mes amis qui m'ont soutenue et supportée pendant les moments difficiles de ce doctorat.

RÉSUMÉ

La nécessité de nouveaux modes de suppléance hépatique se fait clairement ressentir pour maintenir en vie les patients en attente d'une greffe. Des traitements, basés sur l'utilisation de cellules cultivées dans un environnement adéquat, pourraient même permettre le rétablissement de certains patients en insuffisance hépatique sévère et ainsi éviter la greffe et les traitements immunosuppresseurs associés. Une suppléance hépatique efficace pourrait aussi servir au rétablissement des patients récemment greffés ou ayant subi une hépatectomie.

L'objectif de cette thèse a été de développer, créer et valider un nouveau foie bioartificiel avec une prise en compte des contraintes réglementaires des médicaments combinés de thérapie innovante. Ce BAL doit pouvoir inclure des bioréacteurs à lit fluidisé perfusés par du plasma et contenant des sphéroïdes d'hépatocytes encapsulés. Des microparticules de verre, ajoutés aux billes d'alginate pour les alourdir, permettent d'obtenir une fluidisation optimale dans du plasma pathologique sans que des effets délétères ne soient observables ni pour les cellules ni pour les propriétés mécaniques des billes. Une méthode de culture cellulaire utilisant un revêtement anti-adhérent sur des boites de Petri en verre permet de produire un nombre important de sphéroïdes viables *in vitro*. Ces sphéroïdes encapsulés peuvent être maintenus vivants et métaboliquement actifs dans un bioréacteur à lit fluidisé pendant au minimum 4 jours.

Pour assurer l'efficacité du BAL et la sécurité des patients, une circulation extracorporelle complexe a été mise au point pour être compatible avec une machine d'épuration extracorporelle commerciale, la Prismaflex® de la société Gambro, déjà utilisée en soins intensifs. Une étude préclinique sur un modèle ovin a montré que le traitement était bien toléré en ce qui concerne les aspects hémodynamiques. La prochaine étape concerne la mise en place d'une étude dans un modèle porcin d'insuffisance hépatique, avant de pouvoir procéder aux premiers essais cliniques.

Mots clefs : foie - foie bioartificiel - organe artificiel - ingénierie tissulaire - bioréacteur - lit fluidisé - microencapsulation- alginate - cellules hépatiques - sphéroïdes - étude préclinique

The need for new liver support devices is clearly felt to allow keeping alive patients waiting for a transplant. Treatments, based on the use of cells cultured in an adequate environment, may even allow the recovery of some patients suffering from acute liver failure and avoid graft and associated immunosuppressive therapies. A hepatic substitution could also be used to reestablish patients recently transplanted or who had underwent an hepatectomy.

The objective of the thesis was to design, create and validate of a new bioartificial liver with consideration for the regulatory requirements of the Advanced Therapies Medical Product (ATMP). This device has to include fluidized bed bioreactors perfused with plasma and hosting alginate-encapsulated hepatocytes spheroids. Microparticles of glass have been added to weight down alginate beads in order to have an optimal fluidization in pathological plasma without negative effects neither on cells metabolism nor on mechanical properties of the beads. A cellular culture method using non adhesive coating in Petri dish led to the production of a large amount of viable spheroids *in vitro*. These encapsulated spheroids can be kept alive and metabolically active in a fluidized bed bioreactor during a minimum of four days.

To ensure the efficacy of the BAL and the safety of patients, a complex extracorporeal circulation was designed to be compatible with a commercial medical device, the Prismaflex® monitor of the company Gambro, already used in intensive care units. A preclinical study on sheeps has shown that the treatment was well tolerated in terms of hemodynamics considerations. The next step is the establishment of a study in a porcine model of liver failure, before we can proceed to the first clinical trial.

Key words: liver - bioartificial liver – artificial organ - tissue engineering - bioreactor - fluidized bed -microencapsulation- alginate- hepatic cells - spheroids – preclinical study

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Le foie est un organe complexe qui possède de nombreuses fonctions. Ces fonctions peuvent être regroupées en trois catégories : synthèse (albumine, protéines de la coagulation…), stockage (maintien de la glycémie, régulation du taux de cholestérol sanguin…) et détoxification (transformation de l'ammoniac en urée, dégradation des globules rouges…). De multiples pathologies peuvent affecter le foie (cancers, cirrhoses, hépatites...). Parmi elles, l'hépatite fulminante est une forme sévère et très morbide d'hépatite. Actuellement, le seul traitement efficace à terme pour ces pathologies hépatiques est la transplantation. Cependant un nombre élevé de patients décèdent en attente d'un transplant. De plus, un lourd et coûteux traitement immunosuppresseur est associé à la transplantation.

Des dispositifs de suppléance artificielle se sont alors développés comme alternative à la greffe de foie et sont maintenant commercialisés (MARS de l'entreprise Gambro, Prometheus de l'entreprise Fresenius Medical Care…). Ces dispositifs se basent sur des procédés physico-chimiques pour détoxifier le sang des patients au travers d'une circulation extracorporelle. Ils ne peuvent néanmoins pas suppléer toute les fonctions du foie, notamment les fonctions de synthèse et de stockage. De ce fait, des dispositifs bioartificiels utilisant l'ingénierie tissulaire et la culture de cellules dans des bioréacteurs ont été étudiés depuis les années 1990. De nombreuses problématiques restent à éclaircir pour le perfectionnement de ces nouvelles thérapies.

L'efficacité des foies bioartificiels repose sur la bonne fonctionnalité cellulaire (choix du type cellulaire, du mode de culture…). De multiples designs de bioréacteurs ont été proposés avec des principes de culture cellulaire bien différents. Depuis une quinzaine d'année, à l'Université de Technologie de Compiègne, au sein de l'UMR CNRS 7338 (laboratoire de biomécanique et de bioingénierie) des travaux ont été accomplis pour l'élaboration d'un bioréacteur à lit fluidisé contenant des cellules humaines encapsulées dans des billes d'alginate. Cette approche a été essentiellement validée par des travaux in vitro à échelle réduite. Il s'agit désormais d'envisager un traitement complet. Dans ce contexte, la fonctionnalité des bioréacteurs repose aussi sur des composants artificiels inclus dans des circulations extracorporelles (oxygénateur, réchauffeur…).

Le but de ce doctorat a été de créer une circulation extracorporelle permettant de faire fonctionner un foie bioartificel à lit fluidisé de manière optimale. Des améliorations ont été apportées au bioréacteur à lit fluidisé dans le cadre du passage à l'échelle humaine avec une perfusion de plasma pathologique. Des validations, *in vitro* à grande échelle et *in vivo* chez l'animal, ont finalement été réalisées dans le but de poursuivre par des essais précliniques chez un modèle animal d'insuffisance hépatique puis dans le futur par de premiers essais cliniques.

CHAPITRE I : **LA SUPPLEANCE HEPATIQUE**

DE L'ETAT DE L'ART AU POSITIONNEMENT DU PROJET SUPPLIVER

I.1 LE FOIE HUMAIN

Le foie est l'un des organes les plus complexes du corps humain sur les plans anatomique, circulatoire et fonctionnel. On lui dénombre plus de 200 fonctions dont certaines sont encore mal connues. Cet organe joue donc un rôle crucial dans le bon fonctionnement du corps humain. Cette section a pour but de présenter succinctement l'anatomie, la physiologie ainsi que les principales pathologies hépatiques.

I.1.1 Anatomie du foie

Le foie pèse environ 1,5kg chez l'adulte soit 1/50 du poids du corps, formant ainsi la masse viscérale la plus importance de l'organisme avec près de trois cent milliards de cellules. C'est l'organe le plus volumineux du corps humain, après la peau.

Le foie est un organe du système digestif. Il est logé dans une région de l'abdomen appelée hypocondre droit, au-dessus du duodénum (cf. figure 1).

Le foie est entouré de la capsule de Glisson. Il est divisé en deux lobes séparés par le ligament falciforme (ou ligament suspenseur), le lobe droit (deux tiers du volume du foie) et le lobe gauche (un tiers du volume) (cf. figure 1). Bien que les lobes soient séparés anatomiquement, il ne semble pas exister de différences fonctionnelles.

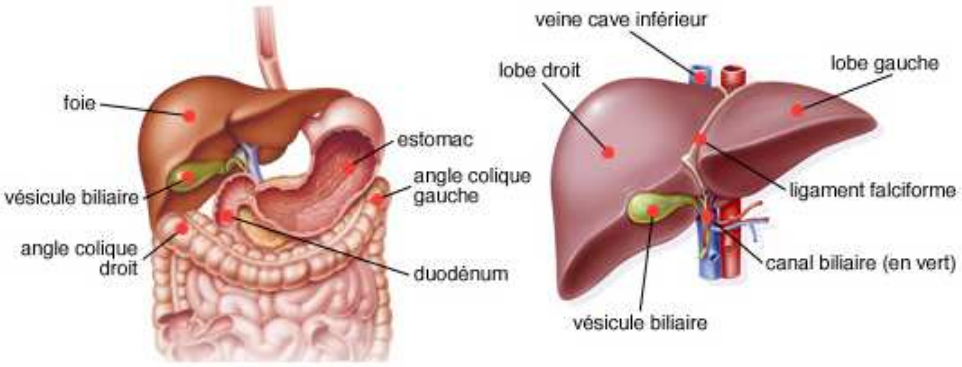


Figure 1: Schémas anatomiques du foie humain [1]

I.1.1.1 Vascularisation

Le foie est un organe très richement vascularisé ce qui lui donne sa coloration rouge brunâtre. Chaque minute, près d'un litre et demi de sang traverse le foie. L'apport vasculaire est mixte ; du sang oxygéné arrive du cœur via l'artère hépatique (25 % du débit sanguin) et du sang non oxygéné mais riche en nutriments arrive des intestins via la veine porte (75% du débit sanguin). Le fait que le foie soit placé sur le trajet sanguin de l'intestin permet à celui-ci de contrôler tout l'apport alimentaire (cf. figure 2). Le retour veineux du foie s'effectue via les veines hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure.

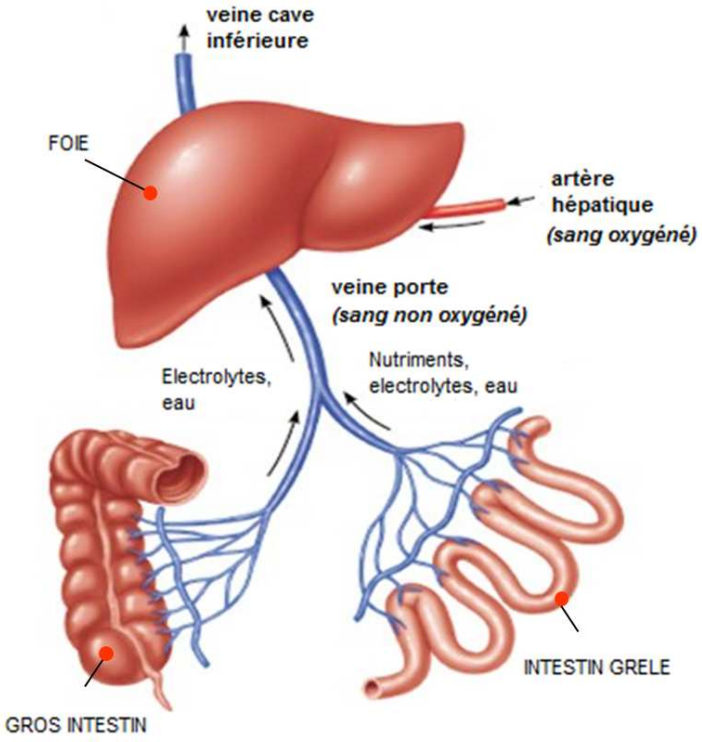


Figure 2: Macro vascularisation du foie [2]

La connaissance de la vascularisation du foie a permis la découverte que celui-ci était constitué de secteurs eux même constitués de segments bien définis avec une vascularisation et des voies biliaires organisées par des plans de clivage précis (scissures). Cette segmentation est absolument à connaitre lors de certaines opérations chirurgicales (lors d'une ablation d'une partie du foie (hépatectomie) ou lors d'un cancer par exemple).

I.1.1.2 Histologie

Il est important d'observer l'agencement microscopique du foie pour comprendre ses fonctions. Une coupe histologique fait apparaitre que les cellules du foie s'organisent en unités fonctionnelles: les lobules et acini hépatiques (cf. figure 3).

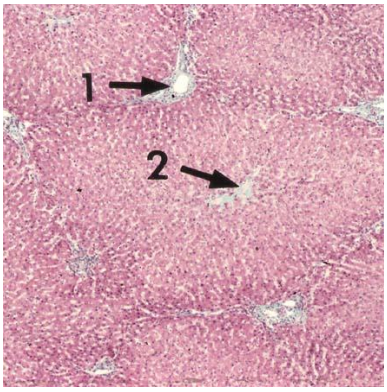


Figure 3: Coupe histologique de foie humain 1-veine porte 2-veine centro-lobulaire [3]

Les hépatocytes (cellules hépatiques) et les cholangiocytes (cellules biliaires) représentent les deux principaux types cellulaires du foie.

Trois unités fonctionnelles différentes sont présentes dans le foie : le lobule hépatique, le lobule portal et l'acinus hépatique. Le foie contient 50.000 à 100.000 lobules hépatiques (cf. figure 4). Ces lobules sont organisés à la manière d'une roue et de ses rayons. Au centre du lobule hépatique polyédrique, qui correspond à l'unité veineuse du foie, se trouve la veine centro-lobulaire. Il est limité à ses angles par les espaces portes. Chaque espace porte contient toujours les trois éléments suivants : une veinule, une artériole et un canal excréteur auxquels sont associés quelques vaisseaux lymphatiques. La veine centro-lobulaire et la veine porte se rejoignent par les sinusoïdes. De part et d'autre de ces sinusoïdes se trouvent les travées d'hépatocytes. De forme triangulaire, le lobule portal est centré par un espace porte et limité à ses angles par des veines centro-lobulaires. Il correspond à l'unité biliaire du foie. Tout autour des espaces portes on trouve les canalicules biliaires qui se déversent dans les conduits biliaires inter-lobulaires lesquels sont constitués de cholangiocytes. L'acinus hépatique est losangique, il est limité par deux veines centro-lobulaires et deux espaces portes. C'est l'unité artérielle centrée sur une branche de l'artère hépatique.

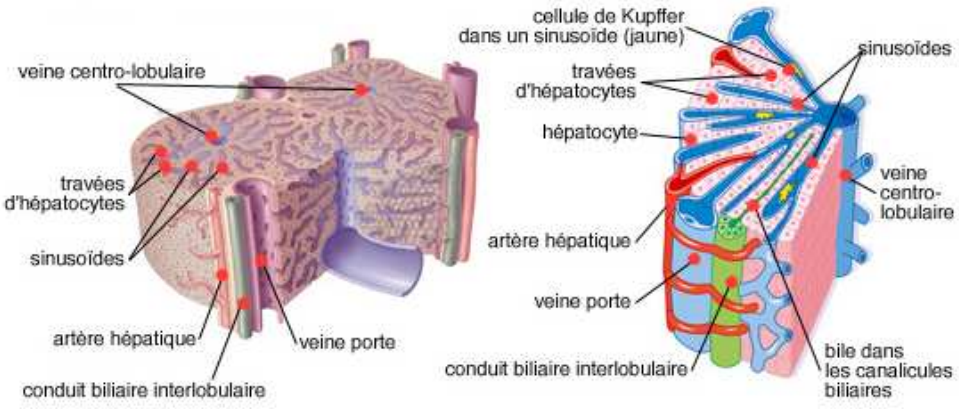


Figure 4: Schémas des lobules hépatiques [4]

Les hépatocytes sont des cellules épithéliales polyédriques qui contiennent un ou deux noyaux et beaucoup d'organites intracellulaires. Ils possèdent une polarisation particulière. Contrairement aux autres cellules épithéliales qui possèdent un domaine apical et un domaine basolatéral, les hépatocytes possèdent une organisation des zones de jonctions qui permet de définir un domaine spécifique : le canalicule biliaire. La membrane plasmique de la cellule est, à ce niveau, très particulière (résistante aux sels biliaires). Chaque hépatocyte est en contact direct, par ces faces pourvues de villosités (pour augmenter la surface d'échange), avec le sang contenu dans les sinusoïdes.

En plus des hépatocytes et des cholangiocytes, il existe d'autres types cellulaires qui sont présents au niveau des sinusoïdes: les cellules de Kupffer, les cellules stellaires ou cellules d'Ito et des cellules endothéliales. Les hépatocytes représentent tout de même 60% du nombre de cellules hépatiques et 80% du poids du foie (cf. figure 5).

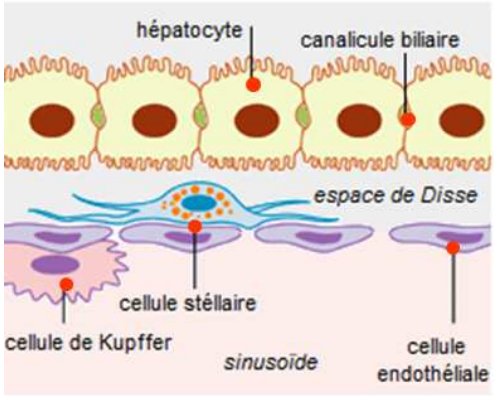


Figure 5: Les cellules du foie [5]

Les sinusoïdes sont des vaisseaux dont les parois discontinues sont formées de cellules endothéliales. Entre ces cellules endothéliales on trouve l'espace de Disse qui héberge les cellules stellaires. Les cellules stellaires sont impliquées dans de nombreux processus métaboliques. Situées du côté de la lumière du sinusoïde, les cellules de Kupffer ont quant à elles un rôle similaire à celui des macrophages. Elles dégradent notamment les veilles hématies par phagocytose.

I.1.2 Physiologie du foie

Le foie assure trois grandes fonctions principales : une fonction d'épuration, une fonction de stockage et une fonction de synthèse. En effet, le foie est la plus grande glande du corps humain, à la fois endocrine (relargage dans les sinusoïdes) et exocrine (sécrétion de la bile). Il a un rôle important pour le maintien de l'homéostasie. En effet, le foie, chez les animaux ne s'alimentant pas continuellement, comme chez l'être humain, assure de manière continue la distribution dans le corps des matériaux susceptibles d'être transformés en énergie.

I.1.2.1 Stockage et livraison des nutriments

L'apport alimentaire arrive des intestins directement au foie par la veine porte. Le foie stocke ou transforme les nutriments en vue de leur assimilation.

Le foie a un rôle primordial dans le maintien d'un taux normal des sucres dans le sang (glycémie autour de 1g/L ou 100 mg/dl). Trois sucres sont assimilés par les intestins : le fructose, le galactose et le glucose. Le métabolisme de ce dernier va être étudié plus en détail.

Le glucose est utilisé par toutes les cellules pour produire de l'énergie via le processus de glycolyse. Après un repas, le taux de glucose dans le sang est augmenté. Au niveau des sinusoïdes, cette élévation de la glycémie entraine une augmentation de la perméabilité du glucose au niveau des hépatocytes par des transporteurs spécifiques. Le glucose va alors être métabolisé en glycogène (glycogenèse) et stocké au sein des hepatocytes comme réserve. Cette voie métabolique est stimulée par un fort taux d'insuline dans le sang. En période de jeûne, c'est le glucagon qui va stimuler le foie pour produire du glucose via la glycogénolyse (dégradation du glycogène en glucose) ou via la néoglucogenèse (synthèse de glucose à partir de substrat non glucidique comme les acides aminés ou le lactate…). Les enzymes permettant cette néoglucogenèse sont présentes chez les hépatocytes situés proche des veinules portales (hépatocytes péri-portaux).

Il existe donc, au sein des travées d'hépatocytes, une hétérogénéité métabolique. Cette hétérogénéité métabolique, aussi appelée zonation, est due au gradient d'oxygène présent au sein du sinusoïde (cf. figure 6).

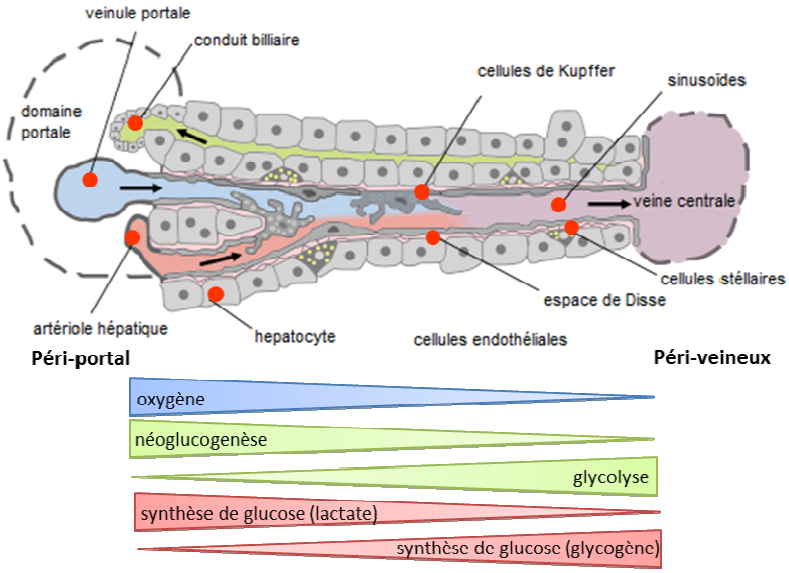


Figure 6: Zonation du métabolisme glucidique [6]

Les protéines de l'apport alimentaire sont, quant à elles, principalement dégradées en acides aminés par le foie. Celui-ci synthétise à partir des acides aminés beaucoup d'autres protéines, essentiellement des protéines plasmatiques comme l'albumine (environ 10 à 30 mg/jour soit environ 1mg/heure [7]). Ces protéines ne restent pas au niveau du foie mais sont excrétées dans la circulation générale. L'albumine est quantitativement la principale protéine plasmatique. Elle a un rôle très important dans la régulation de la pression oncotique du sang, empêchant notamment la fuite de liquide vers le milieu extracellulaire. Elle transporte dans le sang de nombreuses molécules notamment des toxines. Le foie synthétise aussi des protéines de la coagulation (essentiellement pro-coagulante c'est-à-dire qui favorisent la coagulation). Parmi les autres protéines synthétisées par le foie, on trouve des protéines de l'inflammation et de nombreux facteurs de croissance.

Les lipides sont aussi métabolisés par le foie. Le foie est, entre autres, le principal organe de contrôle de l'homéostasie du cholestérol. Le cholestérol est indispensable au bon fonctionnement des membranes cellulaires, à la croissance et au renouvellement des cellules. Son accumulation peut par contre être problématique notamment au niveau de la circulation sanguine (athérosclérose). Le foie synthétise la quasi-totalité du cholestérol fabriqué par l'organisme mais il est aussi le principal responsable de sa capture et de son élimination grâce à des récepteurs situés sur la membrane sinusoïdale des hépatocytes.

En cas d'excès de cholestérol, celui-ci est éliminé via la bile. Le foie peut aussi synthétiser à partir d'acides gras de petite taille des acides gras plus volumineux (triglycérides).

Le foie joue aussi un rôle important dans l'assimilation des vitamines. Certaines vitamines liposolubles doivent être activées dans le foie (les quatre principales sont A, D, E et K). Elles peuvent aussi être stockées dans le foie pour être ensuite relargées vers le reste de l'organisme.

I.1.2.2 Traitement des déchets organiques

Certaines substances issues du métabolisme cellulaire (endogènes) ou issues de l'alimentation (exogènes) peuvent être toxiques pour l'organisme. Le foie joue un rôle crucial pour l'élimination des toxines liposolubles (70 à 80 % des toxines), les toxines hydrophiles étant directement éliminées via les urines.

Parmi les toxines endogènes, on trouve l'ammoniac qui est le produit final de la dégradation des protéines. Les ions ammonium sont toxiques pour le système nerveux central. A de faibles concentrations d'ammoniac, les cellules de nombreux tissus produisent de la glutamine pour l'éliminer. Lorsque la concentration d'ammoniac est élevée et réellement dangereuse pour l'organisme, un autre système, plus efficace, intervient : le cycle de l'urée (cf. figure 7). Ce système d'élimination est spécifique aux hépatocytes. Les enzymes nécessaires au bon fonctionnement du cycle de l'urée se retrouvent surtout chez les hépatocytes péri-portaux. L'urée produite (environ 30 g/jour soit 1,25g/heure) quitte l'hépatocyte par la membrane sinusoïdale et regagne la circulation générale pour être filtrée par les reins et éliminée dans les urines.

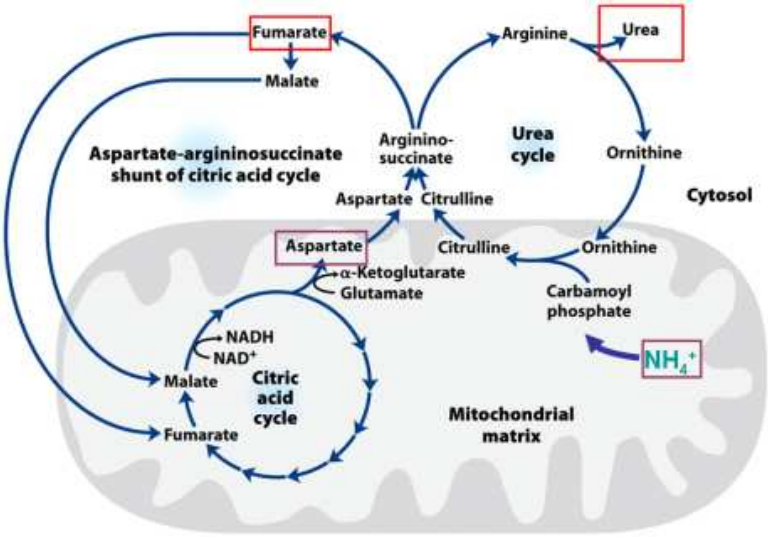


Figure 7: Cycle de l'urée [8]

Le foie intervient aussi dans la dégradation des globules rouges. Il transforme l'hème de l'hémoglobine en bilirubine. La rate est le principal site de production de la bilirubine mais celle-ci est aussi produite par le foie notamment grâce à l'action des cellules Kupffer qui phagocytent les globules rouges âgés. Pour être hydrosoluble et donc éliminée, la bilirubine a besoin d'être conjuguée. Cette conjugaison s'effectue dans le foie. Il s'agit de l'ajout de molécules polaires (deux acides glucuroniques). La bilirubine, une fois conjuguée, quitte l'hépatocyte via la membrane canaliculaire et est éliminée dans la bile.

Des molécules exogènes sont aussi métabolisées par le foie. Les médicaments ou produits chimiques toxiques, comme les pesticides par exemple, sont appelés xénobiotiques. Ce sont des molécules étrangères au corps et pouvant présenter une toxicité même à de très faibles concentrations. Si ces xénobiotiques ne sont pas hydrophiles, ils vont devoir subir des transformations pour réduire leurs effets pharmacologiques et être éliminés lors du processus de biotransformation. Plusieurs organes possèdent les enzymes nécessaires à cette biotransformation (foie, rein, poumons et intestin). Une ou deux phases de biotransformation peuvent être nécessaires. La phase I regroupe les réactions d'oxydoréduction et la phase II les réactions de conjugaison. Certains xénobiotiques ne vont avoir besoin que de la phase de conjugaison pour être éliminés. Les xénobiotiques sont surtout pris en charge par les hépatocytes péri-centraux.

I.1.2.3 Production et excrétion de la bile

La bile est composée de sels biliaires. Ces sels sont produits exclusivement dans le foie à partir du cholestérol. Ils sont amphiphiles ce qui leur permet de maintenir les lipides en solution aqueuse. Ils permettent donc une meilleure digestion des lipides alimentaires et un maintien du cholestérol excédentaire dans la bile pour son élimination. Les sels subissent un cycle entéro-hépatique : de retour au foie après un passage dans l'intestin grêle ils sont recapturés par les hépatocytes pour être de nouveau sécrétés dans la bile (cf. figure 8).

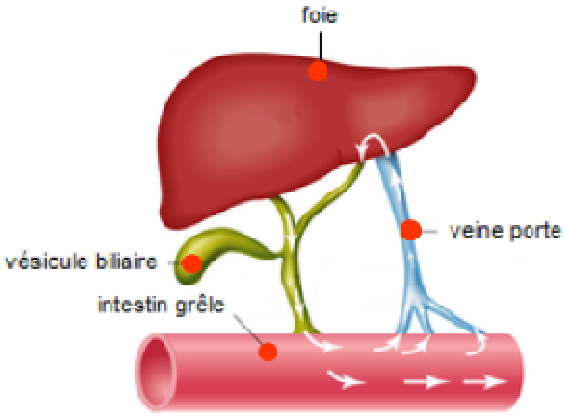


Figure 8: Cycle entéro-hépatique des sels biliaires [9]

Les cholangiocytes des conduits biliaires interviennent aussi dans la production de la bile notamment en modifiant la composition ionique de la bile venant des hépatocytes. Enfin, la vésicule biliaire concentre la bile et la stocke pour une excrétion lors de la prise d'un repas.

I.1.2.4 Régénération hépatique

Le foie possède une capacité très importante de régénération. Bien que les cellules hépatiques aient une durée de vie limitée (300 à 500 jours), très peu de mitoses spontanées surviennent sur un foie normal et au repos (1 sur 20 000 cellules). Lors d'une hépatectomie (ablation chirurgicale partielle du foie), les hépatocytes peuvent se diviser jusqu'à deux fois pour renouveler la masse hépatique. Si 75% du foie est retiré, il faut environ 4 mois à un être humain pour qu'il y ait régénération complète de l'organe. De plus, ce phénomène est reproductible. Cette régénération vient du fait qu'il existe des mécanismes de régulation de la croissance hépatique pour que le foie s'adapte à son hôte (on retrouve ce phénomène dans le cas des greffes hépatiques). Lors de la régénération hépatique, de l'alpha foetoprotéine est retrouvée dans le sang des patients. Cette protéine, synthétisée par les hépatocytes non matures, est aussi un marqueur tumoral notamment pour le diagnostic du carcinome hépatocellulaire (cancer hépatique).

I.1.3 Pathologies hépatiques

Le foie assure de nombreuses fonctions vitales et de nombreuses atteintes de celui-ci peuvent créer des graves troubles dans le fonctionnement du corps humain. Le but de cette section n'est pas de décrire précisément toutes les maladies du foie mais de faire une revue succincte des principales anomalies hépatocellulaires.

I.1.3.1 Hépatites

Les hépatites sont des inflammations du foie qui peuvent être dues à de multiples causes : des intoxications (médicamenteuses avec par exemple du paracétamol), des virus (Notés de A à G, les virus infectent des cellules hôtes pour se répliquer provoquant leur explosion) ou encore des maladies auto-immunes. Les symptômes sont variables d'un patient à l'autre. Il peut s'agir de fatigues, de fièvres ou de nausées mais la plupart des hépatites sont asymptomatiques.

Dans les cas les plus sévères, une destruction importante du foie peut survenir mais la majorité des hépatites se guérissent avec le temps (hépatite aiguë). Dans le cas contraire, l'hépatite est dite chronique.

Certaines hépatites aiguës évoluent très rapidement vers des complications très dangereuses : ce sont des hépatites dites fulminantes ou insuffisances hépatiques aiguës.

I.1.3.2 Cirrhoses

Les cirrhoses sont des maladies dues à des agressions biochimiques répétées du foie. Elles peuvent aussi être la conséquence de maladies chroniques du foie. Les cirrhoses sont le fait d'un alcoolisme ou d'une hépatite C. Dans la quasi-totalité des cas, quelque soit la cause de la cirrhose, la maladie est liée à une accumulation anormale de graisses (stéatose) ce qui conduit à des lésions irréversibles. Un tissu cicatriciel remplace ensuite les cellules endommagées : c'est ce que l'on nomme la fibrose (cf. figure 9). Le tissu fibreux à terme empêche la vascularisation correcte de l'organe et les cellules hépatiques se régénèrent de façon anarchique ne respectant plus l'organisation en lobule.

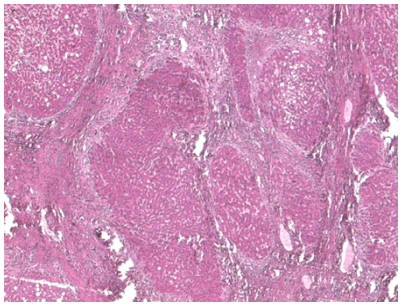


Figure 9 : Coupe histologique d'un foie atteint de cirrhose [10]

I.1.3.3 Cancer

Les cancers du foie les plus fréquents sont les cancers issus de métastases d'autres organes (du colon par exemple). Le rôle de filtre du foie le rend très susceptible d'être envahi par des métastases (notamment des autres organes du système digestif). Les cancers hépatiques issus d'une tumeur hépatique (cancers primitifs) sont 9 fois sur 10 causés par un carcinome hépatocellulaire. Cette pathologie apparait quasiment toujours sur des foies déjà atteints par une autre maladie. Le cancer primitif se développe au niveau d'un foyer initial localisé puis métastase rapidement dans le foie lui-même via le réseau porte.

Parmi les pathologies citées, l'hépatite fulminante va être étudiée plus en détail car c'est l'une des principales maladies cibles de la grande majorité des suppléances hépatiques bioartificielles (notamment car une guérison pourrait être attendue grâce au traitement). Cependant, les suppléances bioartificielles semblent être particulièrement adaptées dans le cas d'épisodes aigus touchant les patients atteints de maladies hépatiques chroniques comme les cirrhoses ou pour les patients se remettant d'une greffe hépatique.

I.2 L'HEPATITE FULMINANTE

L'hépatite fulminante, ou insuffisance hépatique aiguë, correspond à une nécrose massive du parenchyme hépatique (partie fonctionnelle du foie). Il en découle une atteinte grave des fonctions hépatocellulaires (synthèse et détoxification) en moins de 12 semaines. Dans de très nombreux cas, il n'y a aucune maladie hépatique préexistante. L'incidence de l'hépatite fulminante dans les pays dits « développés » est d'environ 10 cas pour 1 million de personnes par an (soit plusieurs centaines de cas par an en France).

I.2.1 Classification, causes et symptômes

I.2.1.1 Classification

Une classification anglo-saxonne définit trois types d'hépatite fulminante : suraiguë, aiguë et subaiguë (cf. tableau 1).

Tableau 1: Classification des hépatites fulminantes [11]

Type d'hépatite	Suraiguë	aiguë	subaiguë
Temps entre la jaunisse et l'encéphalopathie (cf. I.2.1.3 Symptômes)	0-1 semaine	1-4 semaines	4-12 semaines
Taux de survie sans transplantation	Bonne	Moyenne	Faible
Cause typique	Paracétamol, hépatite A et E	Hépatite B	Hépatite médicamenteuse non acétaminophène

Dans les cas très avancés de la maladie, les capacités de régénération sont alors réduites (80 à 85% de mortalité spontanée sans traitement). L'évolution de la maladie peut être extrêmement rapide (quelques heures) se généralisant par une défaillance multi-organes.

I.2.1.2 Causes

Les causes de l'hépatite fulminante sont multiples et diffèrent géographiquement parlant. Les systèmes de santé performants (hauts niveaux d'hygiène et vaccinations) des pays dits « développés » ont permis un contrôle, dans une certaine mesure, des hépatites virales. Ces dernières sont par contre les premières causes d'hépatites fulminantes dans les pays dits « en voie de développement ». Dans le cas des pays dits « développés » les hépatites fulminantes sont très largement médicamenteuses (cf. figure 10).

Parmi les médicaments incriminés : le paracétamol ; qui peut être responsable de plus de la moitié des hépatites fulminantes. En vente sans ordonnance dans de nombreux pays, la moitié des intoxications serait involontaire et donc due à un surdosage par automédication [12]. Pour un certain nombre d'hépatites fulminantes (15 à 40%), la cause n'est pas connue malgré les investigations menées.

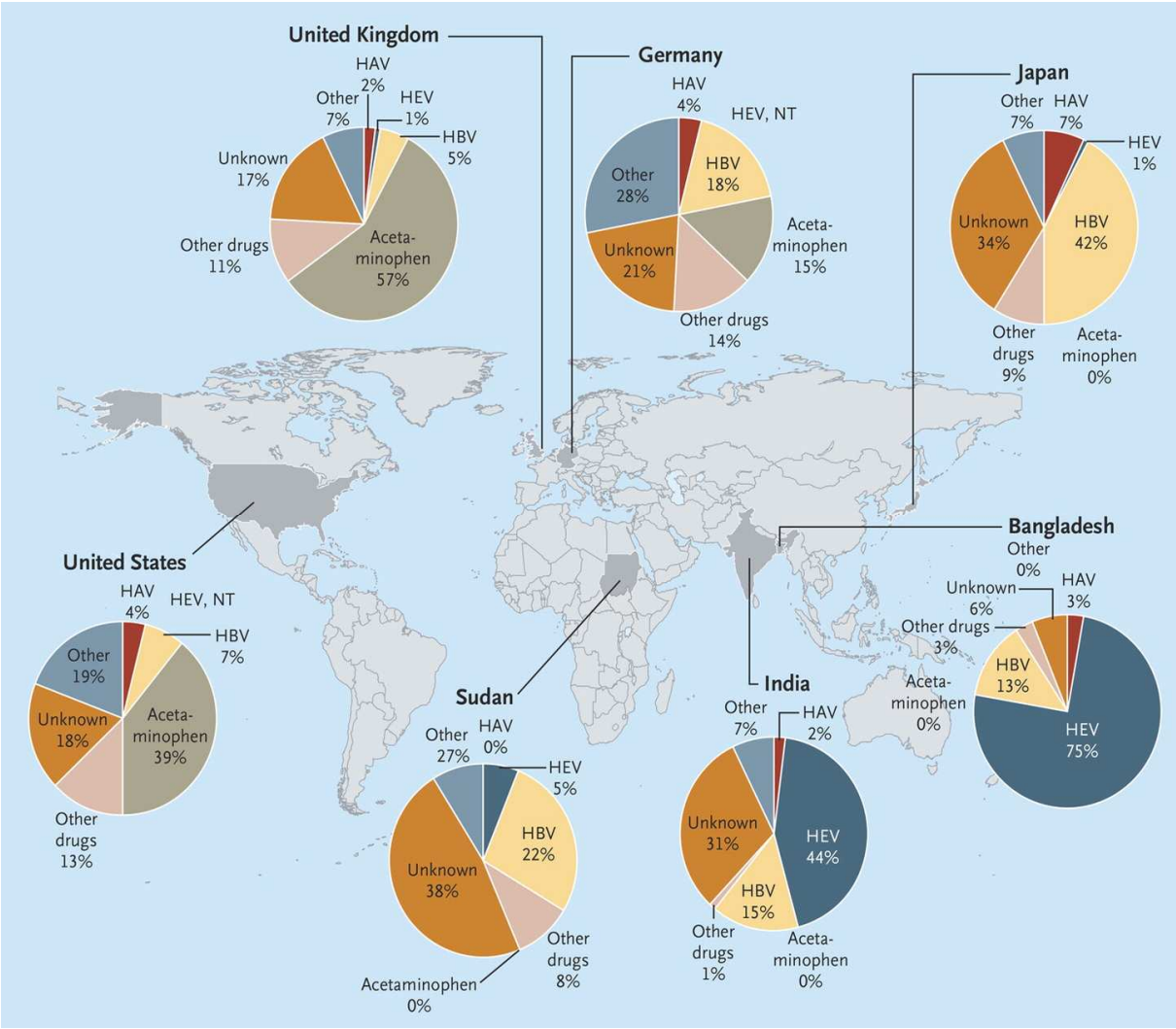


Figure 10: Causes des hépatites fulminantes dans le monde (HAV hépatite virale A, HBV hépatite virale B, HEV hépatite virale E) [13]

I.2.1.3 Symptômes

Les symptômes décrits ici sont plus généralement ceux que l'on peut observer en cas d'insuffisance hépatique sévère.

Une déficience des fonctions de synthèse va entraîner une hypoglycémie résultant d'une baisse de la néoglucogenèse hépatique, d'une altération du relargage des hydrates de carbone, et de variations des concentrations sériques en insuline et glucagon. Il existe aussi chez les patients insuffisants hépatiques une hypoalbuminémie qui peut provoquer des problèmes d'accumulation d'eau dans les tissus (œdème, ascite et épanchement pleural).

Le foie produit aussi normalement des protéines ayant un rôle dans la coagulation. Une atteinte hépatique peut donc provoquer une coagulopathie avec des risques importants d'hémorragies. De façon plus générale, la protéinémie (taux de protéines dans le plasma) descend en dessous des valeurs standard (65 à 80g/L).

Des symptômes liés à la fonction de détoxification peuvent amener à des complications sérieuses avec des atteintes au niveau neurologique. Une mauvaise élimination de la bilirubine provoque une coloration jaune de la peau communément appelé jaunisse (ou ictère). D'autre part, une encéphalopathie peut survenir due à l'accumulation de nombreuses molécules neurotoxiques (ammoniac (> 50-100 µmol/L), mercaptans, acides gras…). Ces substances ont des poids moléculaires faibles à moyens. Encore aujourd'hui, les molécules incriminées dans l'encéphalopathie ne sont pas encore toutes clairement identifiées. Quatre stades d'encéphalopathie permettent de distinguer plusieurs étapes d'aggravation de la maladie (cf. tableau 2).

Tableau 2: Manifestations cliniques de l'encéphalopathie en 4 stades

Stades de l'encéphalopathie	Symptômes	Mortalité
I	Confusion légère, désorientation	-
II	Confusion modérée, somnolence	30-35%
III	Confusion sévère, troubles de la parole	40-60%
IV	Coma réactif aux stimuli puis aréactif	>80%

I.2.2 Traitements actuels et nécessité de nouvelles suppléances hépatiques

A court terme, les patients subissent des soins visant à stabiliser leur état et à suivre l'évolution de la maladie (suivi hémodynamique, administration de glucose, d'antibiotiques, mesure de la pression intracrânienne, …). Cependant, de nos jours le seul traitement efficace pour soigner sur le long terme les insuffisances hépatiques sévères reste la transplantation.

I.2.2.1 La transplantation hépatique

La transplantation hépatique (communément appelée greffe de foie) est la greffe la plus pratiquée après celle du rein. Elle peut se faire à partir d'un foie de donneur décédé ou d'un foie de donneur vivant (parents proches). Dans ce dernier cas, un seul des deux lobes est prélevé. Ces interventions ont un meilleur taux de réussite (meilleure compatibilité, planification de l'intervention qui permet une utilisation immédiate du greffon,...). Malgré la complexité de l'opération et les risques liés à la chirurgie et au rejet, la transplantation reste pourtant très efficace. La survie des patients l'année suivant la greffe est aux alentours de 70%.

La figure ci-dessous (cf. figure 11) montre la répartition en 2011 des patients nécessitant une greffe selon l'étiologie de l'insuffisance hépatique (Ces chiffres, issus de l'agence de biomédecine, sont assez stables de 2006 à 2011.).

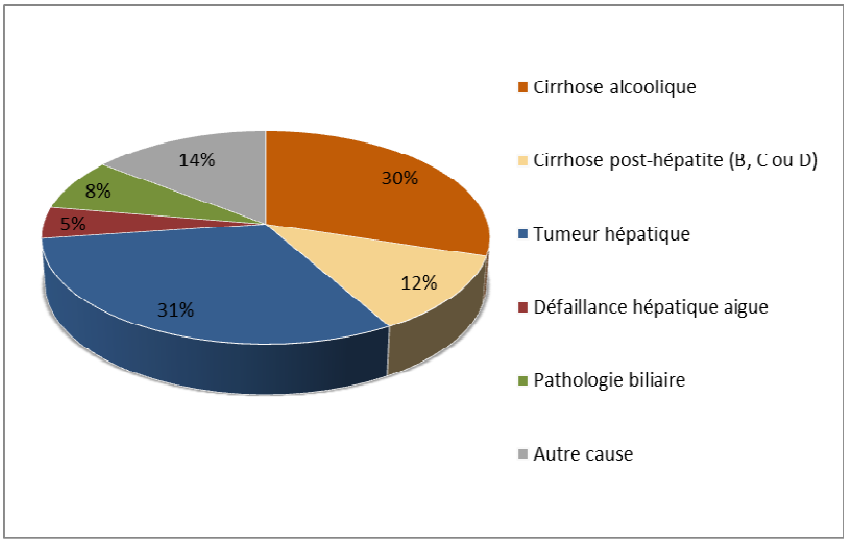


Figure 11: Incidence du nombre de nouveaux inscrits en 2011 en attente d'une greffe hépatique selon l'indication (Agence de biomédecine, 2014).

L'insuffisance hépatique sévère ne compte que pour 5% des patients en attente d'une greffe hépatique. La majorité des patients en attente sont des patients atteints soit d'un cancer soit d'une cirrhose alcoolique.

Une pénurie de donneurs rend actuellement le nombre de dons inférieur à celui des patients nécessitant une greffe. Les malades sur liste d'attente sont de plus en plus nombreux (cf. figure 12).

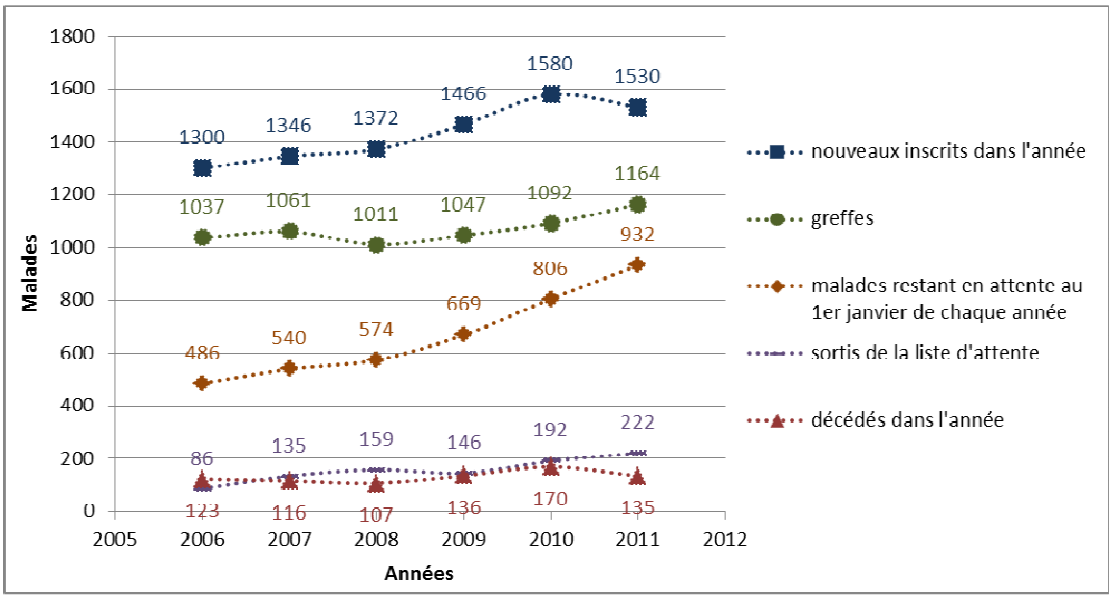


Figure 12: Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe hépatique (Agence de biomédecine, 2014)

Un peu moins de 10% des malades meurent en attendant une greffe. Ce chiffre reste stable malgré l'augmentation très importante des patients sur liste d'attente grâce à une bonne gestion des patients prioritaires et aux soins apportés aux malades en attente de greffe.

I.2.2.2 Nécessité de nouvelles suppléances hépatiques

La nécessité de nouvelles suppléances hépatiques se fait clairement ressentir pour permettre de maintenir en vie les patients en attente d'une greffe. Ces traitements pourraient même permettre le rétablissement de certains patients atteint d'hépatite fulminante et ainsi éviter la greffe et les traitements immunosuppresseurs associés. La suppléance hépatique pourrait aussi servir au rétablissement des patients récemment greffés ou ayant subi une hépatectomie. Enfin, certains cas pour lesquels la transplantation n'est pas envisageable pourraient par contre profiter d'une suppléance hépatique pour voir leur état s'améliorer.

En parallèle de ces suppléances, l'amélioration des techniques de transplantation (séparation des foies de donneurs décédés, élargissement des possibles donneurs sains (conjoint, autres parents) et la prévention des comportements à risques (alcoolisme, utilisation abusive de paracétamol,…) sont aussi à encourager.

On peut diviser les suppléances hépatiques en trois catégories: les suppléances biologiques, artificielles et bioartificielles.

I.3 LA SUPPLEANCE HEPATIQUE BIOLOGIQUE

Outre la transplantation hépatique d'autres alternatives de suppléances biologiques ont été expérimentées. Il s'agit de suppléer la fonction du foie grâce à une alternative uniquement d'origine biologique (organes, liquides biologiques ou cellules).

I.3.1 La circulation croisée

L'une des premières expériences poussées de suppléance hépatique biologique a été menée par Burnell et al. en 1967 [14]. Il s'agissait d'une circulation croisée interhumaine. Leur expérience constituait à connecter, par une circulation extracorporelle, un patient insuffisant hépatique à un autre être humain sain. On pourrait résumer cette intervention à un don d'organes qui n'est alors que temporaire.

Des améliorations de l'état du patient atteint d'insuffisance hépatique ont été observées. Cependant les effets délétères provoqués chez le sujet sain se sont avérés importants et n'ont pas permis d'envisager l'utilisation de la circulation croisée à des fins thérapeutiques. Cette technique a néanmoins permis de faire naître l'idée qu'une suppléance hépatique pouvait exister par l'intermédiaire d'un foie extracorporel.

I.3.2 Plasmaphérèse et transfusion

Les toxines, accumulées lors d'une insuffisance hépatique, circulent dans le plasma sous forme libre (hydrosoluble) ou liée à l'albumine. Un autre type de don que le don d'organes peut donc être envisagé : le don de plasma. Le plasma pathologique est extrait par une plasmaphérèse. Il s'agit d'une circulation extracorporelle dans laquelle une membrane de plasmafiltration est utilisée pour extraire et éliminer une partie plasma du sang circulant tout en préservant et restituant les éléments figurés au patient. Le plasma pathologique est éliminé et remplacé par une transfusion de plasma de donneur sain et compatible ou par une solution de remplacement (une solution d'albumine par exemple) (cf. figure 13).

Cette technique, qui a l'avantage d'être assez simple, est utilisée très fréquemment pour traiter les patients en insuffisance hépatique. Elle comporte néanmoins certains risques. Les complications peuvent être dues à l'accès vasculaire, à l'anticoagulation, à une infection ou encore à une allergie. De plus, il y a, à la suite d'un traitement, des déséquilibres chez le patient (baisse des facteurs de croissance des hépatocytes,…) [15].

Enfin, la plasmaphérèse doit souvent être répétée un nombre important de fois et nécessite donc un grand volume de plasma de substitution.

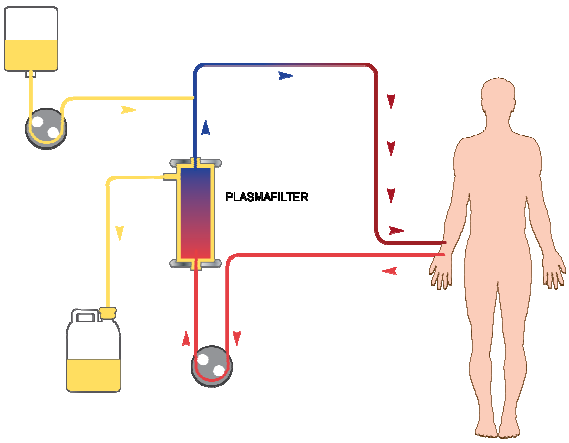


Figure 13: Schéma d'une plasmaphérèse (Aferetica)

I.3.3 La transplantation d'hépatocytes

Une autre alternative à la transplantation classique d'un foie entier ou d'une partie du foie serait une transplantation d'hépatocytes. Les progrès de la culture cellulaire permettent d'envisager maintenant l'option d'une implantation de cellules hépatiques.

De nombreuses problématiques associées à la culture cellulaire existent encore et seront présentées dans la partie du manuscrit sur la suppléance bioartificielle (choix du type cellulaire, nombre de cellules nécessaires,…).

Mais un problème majeur, spécifique à la technique de transplantation d'hépatocytes, est le choix du site d'implantation pour pouvoir transplanter suffisamment de cellules et obtenir une bonne vascularisation de l'implant (injection dans la circulation générale, implantation dans la cavité péritonéale,…).

Des études chez l'animal ont montré que la transplantation d'hépatocytes permet une augmentation du taux de survie des animaux traités [16]. En 2011, l'équipe du King's College Hospital de Londres a implanté avec succès des hépatocytes enrobés de biopolymère chez un nourrisson, mais il est difficile de dire si le rétablissement de celui-ci n'a finalement pas été le fait d'une guérison spontanée qui peut être quelquefois observée [17].

I.4 LA SUPPLEANCE HEPATIQUE ARTIFICIELLE

La suppléance hépatique artificielle est née de l'évolution des systèmes utilisés pour la suppléance rénale. Le rein ayant essentiellement un rôle de filtration, sa fonction a pu être assez bien mimée par des dispositifs uniquement artificiels (circulations extracorporelles comportant des filtres ayant des porosités bien définies). Les systèmes ont peu à peu évolué pour répondre aux attentes spécifiques de détoxification d'une suppléance hépatique.

I.4.1 Les systèmes artificiels conventionnels

I.4.1.1 Hémodialyse, hémofiltration et hémodiafiltration

L'hémodialyse et l'hémofiltration conventionnelles sont des techniques d'épuration du sang par l'intermédiaire d'une circulation extracorporelle contenant un filtre (ou dialyseur) sous forme de fibres creuses. Le traitement d'hémodialyse consiste à réaliser des échanges entre le sang et un liquide physiologique (dialysat) grâce à la membrane semi perméable du filtre (cf. figure 14).

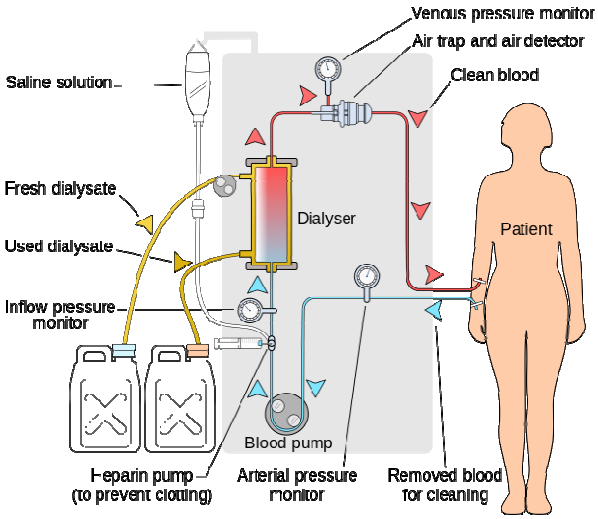


Figure 14: Schéma de l'hémodialyse conventionnelle [18]

Un équilibre de distribution des solutés ou toxines (diffusion) s'établit au travers de la membrane semi-perméable des fibres creuses entre le sang et le dialysat (cf. figure 14).

Pour ce qui est de l'hémofiltration, le procédé convectif tranfère l'eau plasmatique et les solutés de masse molaire inférieure au seuil de coupure au travers de la membrane semi-perméable vers le compartiment filtrat (figure 14).

L'hémodiafiltration est une combinaison des deux méthodes. Il faut noter que seules les substances hydrosolubles sont éliminées par ces techniques.

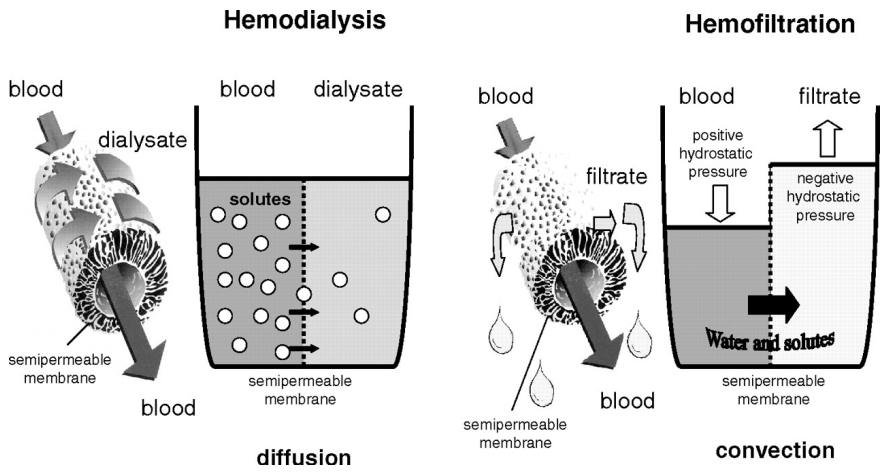


Figure 15: Principe de l'hémodialyse et de l'hémofiltration [19]

I.4.1.2 Plasmaperfusion et hémoperfusion

La plasmaperfusion est basée sur la technique de plasmaphérèse. Cependant, l'idée n'est pas d'éliminer le plasma mais de le traiter par l'intermédiaire de dispositifs artificiels qui adsorbent les toxines (cf. figure 16). Le plasma traité retourne ensuite dans la circulation générale du patient. L'hémoperfusion utilise aussi des techniques d'adsorption mais directement sur le sang.

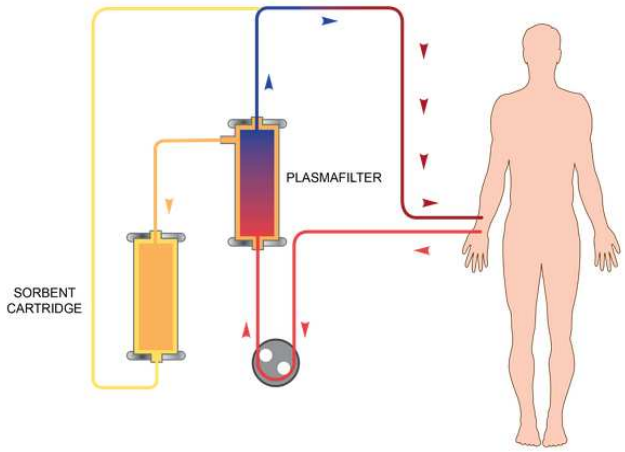


Figure 16: Schéma de la plasmaperfusion (Aferetica)

Le charbon actif et les résines échangeuses d'ions sont des absorbeurs couramment utilisés pour l'épuration des liquides. Le charbon actif est un matériau essentiellement composé de matière charbonnée qui a subi une carbonisation à haute température. Il possède ainsi une grande surface spécifique qui lui donne son fort pouvoir adsorbant (surtout pour de petites molécules hydrophiles) (cf. figure 17).

Les résines échangeuses d'ions sont des polymères modifiés de telle façon que des groupements ioniques soient présents sur leurs chaînes. Chargés positivement ou négativement, ils vont capter les molécules de charge contraire (ces résines sont entre autre utilisées pour capter la bilirubine) (cf. figure 17).

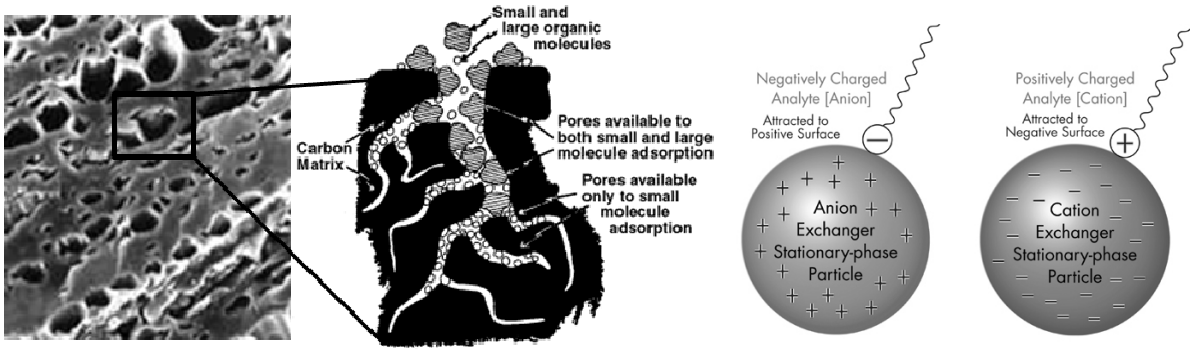


Figure 17: Deux techniques d'adsorption. : A gauche du charbon actif (Filter Water), A droite des billes de résine échangeuses d'ions (Waters)

L'hémoperfusion a prouvé son efficacité pour l'adsorption des molécules de poids moléculaire moyen (dont l'ammoniac), de la bilirubine et des acides gras [20]. De plus, contrairement à la plasmaphérèse, aucun liquide de substitution du plasma n'est requis puisque l'on détoxifie le propre sang ou plasma du patient. On limite ainsi les risques d'infections ou d'allergies.

I.4.2 Les systèmes artificiels évolués

Des systèmes évolués ont été développés en combinant les principes de filtration et d'adsorption. De nouvelles techniques ont été imaginées autour des concepts d'hémodialyse et de plasmaphérèse. Ainsi, la dialyse à l'albumine (une solution concentrée en albumine est utilisée comme dialysat) comprend un filtre dont la membrane permet le passage des toxines liées à l'albumine du sang vers le dialysat. Le dialysat peut être régénéré ou non par filtration ou adsorption. Un travail particulier a été fait sur les membranes des filtres pour trouver les bons seuils de coupure et clairance vis-à-vis des molécules à éliminer. La figure 18 donne une vue d'ensemble des dispositifs artificiels les plus élaborés.

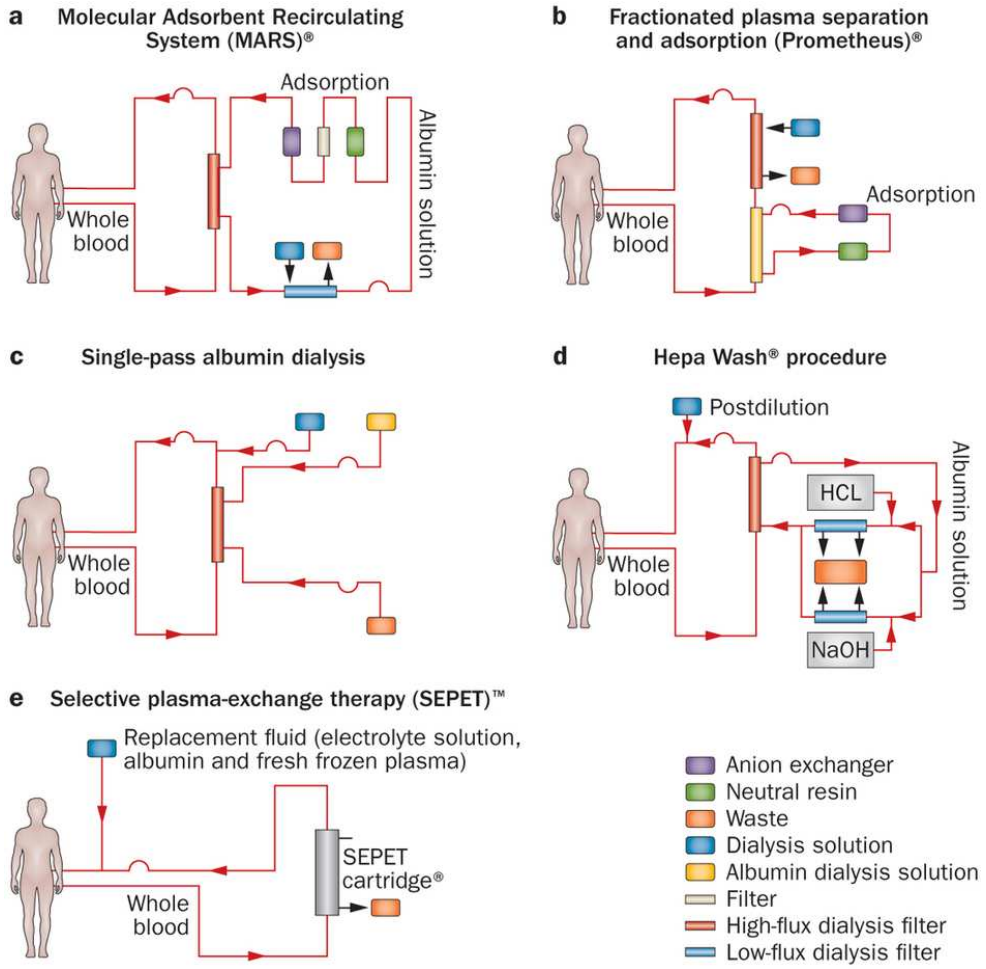


Figure 18: Différents dispositifs artificiels de suppléance hépatique [21]

Parmi ces dispositifs, les deux références sont le MARS et le Prometheus. Ces deux systèmes sont commercialisés et utilisés de manière ponctuelle en clinique.

I.4.2.1 Le système Prometheus

Le système Prometheus commercialisé par Fresenius Medical Care est une combinaison de plasmaperfusion et d'hémodialyse conventionnelle (cf. figure 19). Cependant, contrairement à un plasmafiltre classique, le filtre Albuflow est doté d'un seuil de coupure qui permet de retenir dans le sang les grosses molécules de l'immunité et de la coagulation. Le plasma recircule dans le circuit secondaire, est détoxifié par des adsorbeurs (résines neutres et échangeuses d'anions) puis retourne au patient. La perfusion directe du plasma du patient par les adsorbeurs confère à ce système une grande efficacité d'élimination de l'ammoniac, la bilirubine ou encore de l'urée [22] [23].

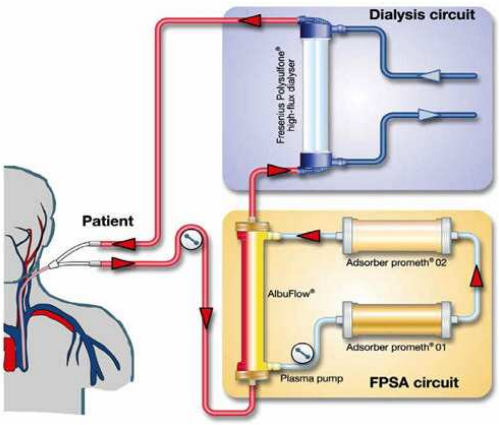


Figure 19: Schéma du dispositif Prometheus (Fresenius Medical Care)

I.4.2.2 Le système MARS

Le système MARS commercialisé par Gambro utilise une dialyse à l'albumine (cf. figure 20). Les toxines hydrosolubles et les toxines liées à l'albumine du patient se retrouvent dans le circuit secondaire, composé d'un dialysat d'albumine concentrée (20% au lieu des 4% du compartiment sanguin) régénérée en continu. Les toxines liées à l'albumine sont captées par des adsorbeurs (charbon actif et résines échangeuses d'ions) et l'élimination des toxines hydrosolubles se fait par une dialyse conventionnelle du circuit secondaire.

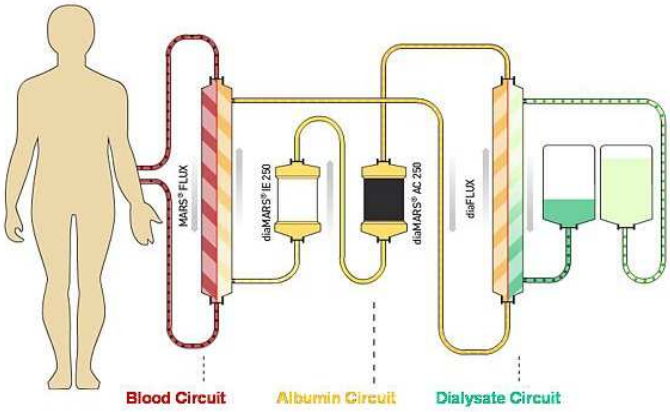


Figure 20: Schéma du dispositif MARS [24]

L'efficacité de cette technique est liée à la membrane du filtre MARS-Flux qui permet le transfert des toxines liées à l'albumine du patient vers l'albumine du circuit de dialysat. La structure asymétrique de cette membrane permet un rapprochement physique entre l'albumine du patient et celle du dialysat sans qu'il y ait de passage possible de l'albumine (cf. figure 21).

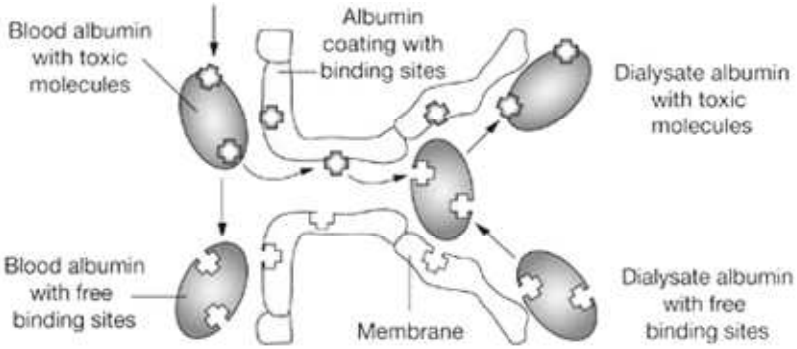


Figure 21: Schéma de la membrane du MARS Flux [25]

Le système MARS s'est montré efficace pour l'élimination des toxines hydrosolubles et des toxines liées à l'albumine de faible et moyen poids moléculaire [26]. De plus, des améliorations de l'état général du patient ont été observées notamment concernant l'encéphalopathie. C'est aussi le seul système à avoir prouvé, lors d'études cliniques, une amélioration du taux de survie des patients [27]. Le désavantage majeur de cette technique est l'utilisation d'une solution concentrée en albumine qui est coûteuse.

Les dispositifs artificiels, bien qu'ayant prouvé leur efficacité concernant l'épuration des toxines libres et liées à l'albumine, n'ont pas encore démontré une réelle efficacité concernant l'amélioration du taux de survie des patients. Une des principales limites de ces suppléances artificielles est due au fait que les techniques d'épuration utilisées (seuils de coupure des filtres et adsorption) sont très peu sélectives. De plus, les mécanismes de l'insuffisance hépatique sévère sont encore mal connus, ce qui rend d'autant plus compliqué le choix du design de ces circulations extracorporelles artificielles. Enfin, les fonctions de synthèse et de stockage du foie ne sont pas du tout supplées. Toutes ces limites ont poussé le développement de suppléances dites bioartificielles qui combinent des éléments artificiels (filtres, adsorbeurs, oxygénateurs, …) et des éléments biologiques (hépatocytes contenus dans des bioréacteurs).

I.5 LA SUPPLEANCE HEPATIQUE BIOARTIFICIELLE

L'inclusion d'éléments biologiques dans des circulations extracorporelles est synonyme de nombreux challenges. Il s'agit de disposer des cellules les plus performantes possible (dans leurs activités de détoxification et de synthèse) avec la nécessité de mettre en place un environnement adéquat par des dispositifs artificiels (oxygénation, maintien à 37°C,…) (cf. figure 22).

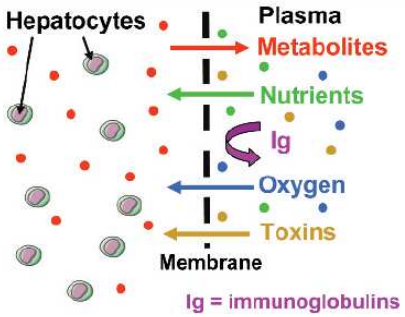


Figure 22: Principe général du fonctionnement d'un foie bioartificiel [28]

I.5.1 Problématiques biologiques

I.5.1.1 Masse cellulaire

Des expériences d'hépatectomies ont montrées qu'il faut qu'il subsiste au minimum 10% de la masse du foie pour que celui-ci puisse se régénérer. Partant de ce constat, ce pourcentage peut être défini comme étant la masse minimale de cellules nécessaire pour effectuer une réelle suppléance capable de produire des effets thérapeutiques quantifiables, en faisant l'hypothèse que les cellules cultivées soient aussi fonctionnelles que celles du corps humain. Ces 10% correspondent à environ 30 milliards de cellules pour un foie adulte.

Les hépatocytes constituant 60% du nombre de cellules hépatiques cela revient donc à environ 20 milliards d'hépatocytes. Il est communément admis qu'il faudrait au minimum 10 à 20 milliards d'hépatocytes (environ 150g) dans une circulation extracorporelle bioartificielle pour qu'il puisse y avoir une efficacité démontrable [29].

I.5.1.2 Choix du type cellulaire

Le choix du type cellulaire est primordial. Il faut en effet pouvoir disposer de cellules en grand nombre, avec un phénotype au plus proche de celui des cellules d'un foie humain sain.

I.5.1.2.1 Cellules primaires

Les cellules humaines primaires (extraites directement d'un foie humain) sont des cellules de premier choix puisque celles-ci devraient pouvoir, sous des conditions de culture adéquates, être dotées d'un phénotype identique à celles d'un foie dans l'organisme. Cependant, ces cellules sont difficiles à obtenir puisqu'un foie de donneur va avant tout être utilisé pour une transplantation. De ce fait, les cellules qui peuvent être récupérées sont des cellules issues de résections (ablations de parties malades du foie) ou de foies non transplantables car trop endommagés. Il existe donc une grande variabilité au niveau de la viabilité et du phénotype des cellules selon les donneurs et les conditions de prélèvement.

De plus, lorsque ces cellules sont cultivées en dehors du corps, elles perdent leur propriété de régénération et se dédifférencient rapidement [30]. A l'heure actuelle, l'origine de ces altérations physiologiques n'est pas encore complètement comprise. Pour avoir un nombre suffisant de cellules primaires humaines, il faudrait pouvoir organiser au mieux la récupération des foies non transplantables ou issus de résections et trouver des moyens de conservation fiables (cryopréservation par exemple) pour constituer des lots de cellules préparés à l'avance et utilisables rapidement. Enfin, un autre inconvénient est que la rareté de ces cellules les rend coûteuses.

Une autre solution envisagée est d'utiliser des cellules primaires animales, notamment celles du porc. Ces cellules peuvent être disponibles immédiatement et en grand nombre. Une importante majorité des foies bioartificiels testés en clinique ont utilisé des cellules primaires de porcs. Cependant des problèmes immunologiques empêchent de faire des traitements successifs sur plusieurs jours [31]. Il existe aussi un risque de zoonose (maladie transmissible des animaux à l'homme).

I.5.1.2.2 Cellules de lignée

Des cellules humaines de lignée (population homogène de cellules stables après plusieurs mitoses) sont aussi utilisées dans certains foies bioartificiels du fait de leur résistance et de leur capacité à proliférer. A cause d'un certain nombre de mutations, ces cellules n'ont pas de limites concernant le nombre de divisions cellulaires et sont donc considérées comme immortelles. Les lignées d'hépatocytes sont très utilisées *in vitro* comme modèle pour étudier les fonctions du foie et certains mécanismes de détoxification. Cependant, ces cellules ne sont pas du tout aptes au métabolisme des drogues dû au fait qu'il leur manque certaines enzymes. De plus, chez les cellules de lignées, des évolutions phénotypiques peuvent être observées au fur et à mesure des divisions cellulaires [30].

Parmi les lignées d'hépatocytes les plus utilisées, on trouve des cellules issues de carcinomes hépatocellulaires (HepG2). Or, il existe un risque que ces cellules s'échappent et atteignent le patient. Des doutes subsistent quant à la possibilité pour ces cellules de produire des substances cancérigènes qu'elles puissent relarguer dans la circulation générale du patient. Bien qu'il reste encore à fournir des preuves de la non dangerosité de ces cellules pour leur autorisation généralisée en clinique, elles restent un choix intéressant pour des étapes de mise au point avant les premières études chez l'homme.

I.5.1.2.3 Cellules souches

Une dernière alternative consisterait à utiliser des cellules souches. Les cellules souches sont capables de produire n'importe quel type cellulaire (pluripotence) et possèdent une bonne capacité de prolifération. De nombreux travaux sont en cours pour une différenciation en cellules hépatiques [32] [33]. Des aspects éthiques peuvent freiner l'utilisation des cellules souches embryonnaires. Des cellules souches différenciables en hépatocytes sont cependant présentes chez l'adulte mais en petit quantité (moelle osseuse et foie). Une des avancées majeures en biologie ces dernières années a été la découverte de la possibilité de créer des cellules pluripotentes induites (iPS) à partir de cellules humaines adultes [34]. Le challenge de ces travaux est de pouvoir arriver à réellement bien contrôler la différenciation et la propagation de ces cellules pluripotentes (souches ou induites) [35].

I.5.1.3 Choix du type de culture

Les hépatocytes (primaires, de lignées ou issus de cellules souches) sont des cellules dites adhérentes. En suspension, elles perdent vite leur fonctionnalité. Elles ont donc besoin d'un ancrage qui peut se faire par divers moyens.

Les cellules peuvent être ancrées sur une couche de matériau biocompatible ou être complètement entourées par celui-ci (comme c'est le cas lors d'une encapsulation de cellules dans des microbilles de gel). Dans l'organisme, les cellules sont entourées de matrice extracellulaire (protéines et protéoglycanes). Cette matrice joue un rôle important dans les activités cellulaires. Certains matériaux d'ancrage peuvent être enrobés de composants de la matrice extracellulaire pour améliorer leur biocompatibilité (en utilisant du collagène par exemple).

Les cellules hépatiques ont aussi besoin d'interactions fortes entre elles. La culture en couche (2 dimensions) ne permet pas de retrouver toutes les interactions que doivent avoir les cellules entre elles et on observe dans ce type de culture une perte des propriétés du tissu hépatique. Des cultures en trois dimensions se sont donc développées.

La culture en sphéroïdes s'est imposée comme une méthode simple et efficace pour améliorer les interactions cellules-cellules (cf. figure 23).

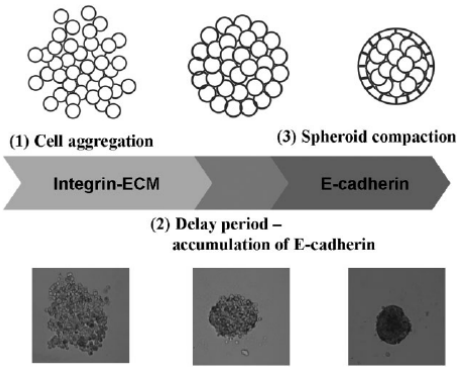


Figure 23: Etapes de la formation d'un sphéroïde [36]

La culture en sphéroïdes est plus complexe que la culture en 2 dimensions mais permet notamment une amélioration de la fonctionnalité des cellules (production d'albumine, synthèse d'urée, activité du cytochrome P450, …) [36]. La figure suivante récapitule les conséquences morphologiques et physiologiques d'une culture en sphéroïdes de cellules de lignée C3A par rapport à une culture classique en 2 dimensions (cf. figure 24).

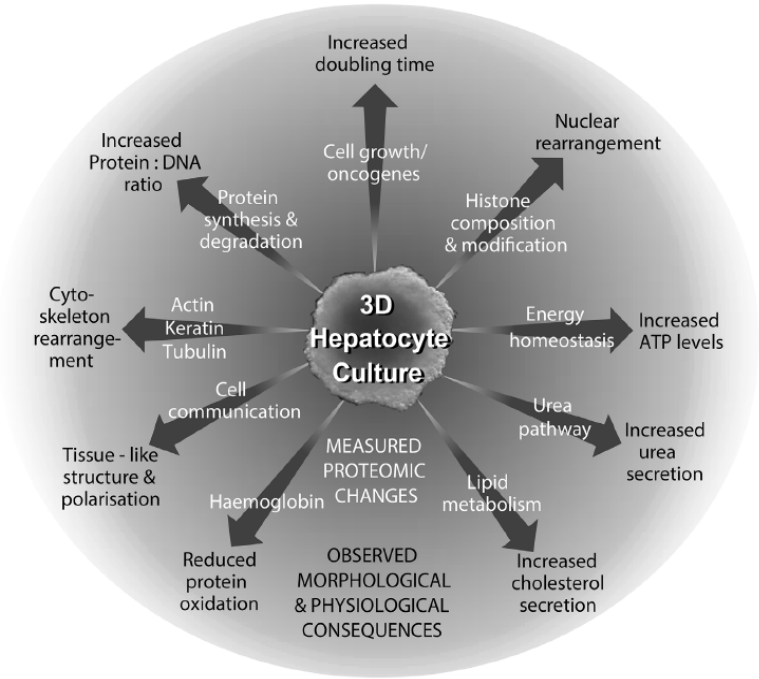


Figure 24: Améliorations dues à une culture en sphéroïdes [37]

Les hépatocytes sont aussi normalement en contact avec les autres cellules du foie. Des développements sont en cours pour associer plusieurs types cellulaires sous forme de co-culture [38] [39].

I.5.2 Problématiques liées au circuit extracorporel

I.5.2.1 Choix du design du bioréacteur

La conception du bioréacteur est une des problématiques clés du développement des foies bioartificiels. Ces bioréacteurs doivent répondre à de nombreux critères.

Ils doivent par exemple pouvoir héberger un nombre très important d'hépatocytes tout en ayant une taille raisonnable pour une mise à l'échelle réalisable. Il est nécessaire que les transferts de masse soient les plus optimaux possibles pour que les cellules soient fonctionnelles pour ce qui est de la détoxification et du relargage des molécules synthétisées. De plus, de l'oxygène doit pouvoir être apporté aux cellules. Il peut donc être imaginer qu'une perfusion directe (cellules directement en contact avec le sang ou le plasma du patient) soit une bonne solution. Cependant, il est important d'assurer une protection vis-à-vis du système immunitaire du patient ce qui nécessite d'utiliser des membranes semi perméables retenant les immunoglobulines. Enfin, il faut que les cellules soient préservées d'un trop grand stress mécanique dû à la perfusion.

I.5.2.1.1 Bioréacteurs à fibres creuses

Le design le plus utilisé dans le domaine de la suppléance hépatique est le bioréacteur à fibres creuses. Développés à partir de dialyseurs ou de plasmafiltres, les bioréacteurs à fibres creuses hébergent des cellules soit au sein des fibres soit dans le compartiment extracapillaire. Les fibres creuses constituent une membrane semi perméable qui sépare les cellules du sang ou du plasma du patient. Cette membrane permet des échanges sélectifs entre les hépatocytes et le milieu extérieur. Il existe cependant certains dispositifs comme l'AMC (Academic Medical Center) ou l'Oxy-HFB (Oxygenated Hollow Fiber Bioreactor) [40] où les cellules sont en contact directement avec le liquide de perfusion et où les fibres creuses permettent le passage du dioxygène. La plupart des membranes possèdent un seuil de coupure proche des 100kDa pour laisser passer l'albumine et éviter le passage des immunoglobulines.

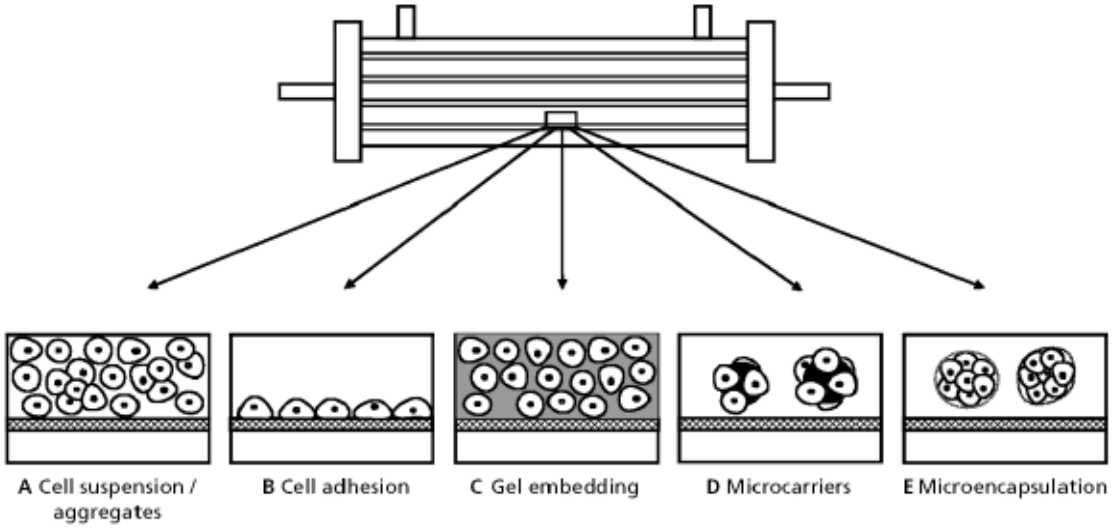


Figure 25: Différentes conditions de culture au sein des bioréacteurs à fibres creuses [41]

Les fibres creuses offrent une grande surface d'ensemencement ce qui permet le passage d'échelle (notamment en cultivant les cellules en 3 dimensions (cf. figure 25). Une des limites de ce type de conception est le manque d'un transfert de masse suffisamment performant pour qu'il y ait de bons échanges au travers de la membrane semi perméable surtout si les cellules sont aussi encapsulées ou enrobées dans un biomatériau.

I.5.2.1.2 Bioréacteurs plans

Les bioréacteurs plans hébergent des cellules qui sont ancrées sur un biomatériau et cultivées en 2 dimensions. Pour mimer au mieux la configuration des hépatocytes au sein du foie, il peut y avoir une superposition de couches de cellules : il s'agit alors d'une culture « sandwich » (cf. figure 26). La perfusion est directe ; il n'y a pas de membrane qui sépare les hépatocytes du milieu de culture. Les cellules peuvent toutefois être enrobées dans un biomatériau pour simuler la matrice extracorporelle. Ce type de bioréacteurs possède un inconvénient majeur qui est celui de la mise à l'échelle. Il faudrait en effet une surface très importante pour pouvoir héberger le nombre de cellules nécessaire à une suppléance hépatique.

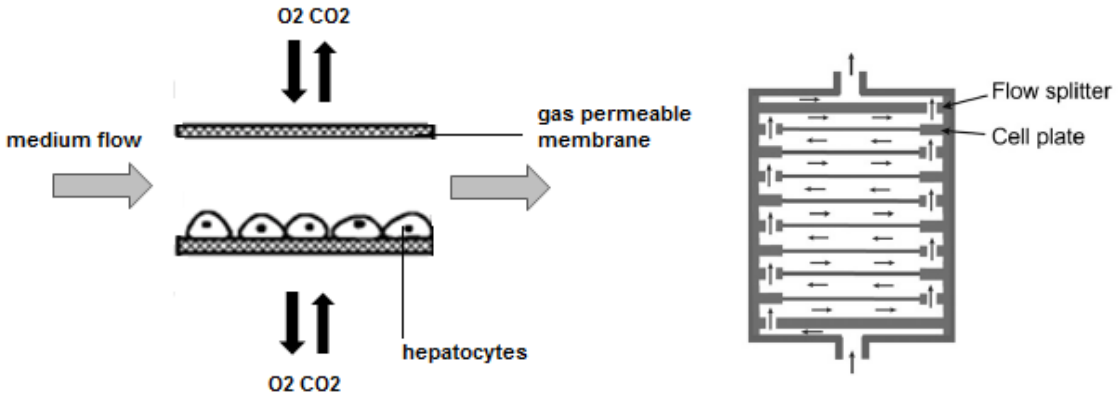


Figure 26: A gauche : Principe de la culture en bioréacteur plat.
A droite : Exemple de bioréacteur utilisant une culture « sandwich » [42]

I.5.2.1.3 Bioréacteurs à lit perfusé

Les bioréacteurs à lit fixe, sont des bioréacteurs où les cellules sont immobilisées dans un biomatériau poreux (billes de biopolymère, mousse polyuréthane,…[43]) dans lequel circule le milieu de perfusion (cf. figure 27). Ce biomatériau peut avoir seulement une fonction de support ou constituer l'équivalent d'une membrane semi perméable pour contrôler les échanges entre les cellules et leur environnement.

Le bioréacteur à lit fixe est intéressant du point du vue de sa capacité à contenir un nombre important de cellules. Il est cependant limité par le fait qu'il peut exister des chemins préférentiels conduisant à une perfusion non homogène du dispositif. De plus, dans un lit fixe d'importantes contraintes mécaniques sont exercées sur les cellules.

Les bioréacteurs à lit fluidisé sont des bioréacteurs où des cellules encapsulées sont mises en mouvement grâce à la perfusion [44] (cf. figure 27). Ce mouvement homogène, aussi appelé fluidisation, permet, par rapport à un lit fixe, une amélioration des transferts de masse et limite le stress mécanique [45]. La fluidisation nécessite toutefois un volume mort (volume qui ne contient pas de cellules) assez important. De plus, les transferts de masse sont tout de même limités par le fait que le biomatériau utilisé pour l'encapsulation agit comme une membrane semi perméable et limite donc les échanges avec le milieu.

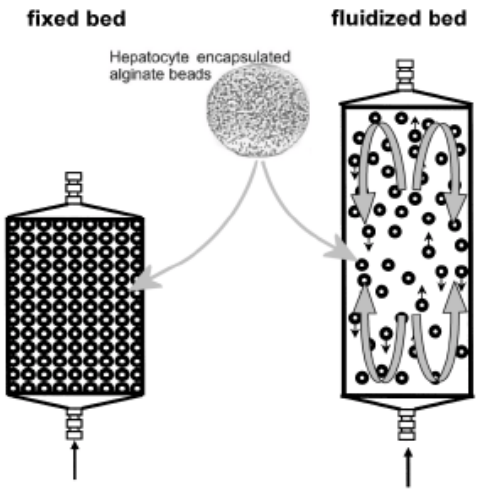


Figure 27: De gauche à droite : Bioréacteur à lit fixe et bioréacteur à fluidisé utilisant l'encapsulation de cellules au sein de microbilles d'alginate [46]

I.5.2.1.4 Autres designs

Il est difficile de répertorier et de catégoriser tous les différents bioréacteurs. D'autres designs existent ne rentrant dans aucune des catégories mentionnées précédemment. Certains bioréacteurs peuvent notamment, en plus de la perfusion, inclure des mouvements de rotation pour assurer de bons transferts de masse au sein du dispositif [47]. D'autres encore se passent de réels bioréacteurs en se servant d'un circuit secondaire de la circulation extracorporelle pour faire circuler des cellules encapsulées [48].

I.5.2.2 Choix du design de la circulation extracorporelle

Le choix du design de la circulation extracorporelle est aussi une étape importante pour garantir l'efficacité du dispositif de suppléance bioartificielle. Premièrement, il s'agit de définir le type de perfusion. Les perfusions directes de sang total mènent en général à des problèmes de coagulation, voire immunologiques si il n'y a pas de barrière entre les lymphocytes et les cellules hépatiques non autologues. La quasi-totalité des bioréacteurs sont maintenant perfusés avec du plasma. Les circulations extracorporelles contiennent donc des dispositifs de filtration (plasmafiltre classique ou filtre un peu plus sélectif retenant les immunoglobulines). Sans les globules rouges du sang, l'oxygénation des cellules se fait moins bien. Idéalement la circulation doit donc incorporer un système d'oxygénation. Les cellules doivent aussi être maintenues à 37°C par un dispositif de chauffage. Il peut aussi être intéressant de détoxifier en amont le plasma par des systèmes artificiels (plasmaperfusion, hémodialyse,…) et ainsi éviter le contact des cellules avec un plasma très toxique.

De plus, une perfusion de nutriments (glucose notamment) peut être utile à mettre en place dans le circuit extracorporel.

Comme pour tout dispositif médical, les éléments du circuit doivent être biocompatibles, voire hémocompatibles, et stérilisables. Il convient que le dispositif dans son ensemble soit assez simple d'utilisation et dispose d'un système de pilotage et de détecteurs permettant une gestion d'alarmes pour assurer la sécurité des patients. Enfin, une procédure de transport adéquate doit aussi être élaborée pour permettre une efficacité optimale du système au lit du patient.

La figure 28 donne des exemples de circulations extracorporelles ayant été testées en clinique. On note des similitudes chez tous les circuits présentés : un maintien à 37°C et une oxygénation (qui peut se faire en amont du bioréacteur ou au cœur de celui-ci).

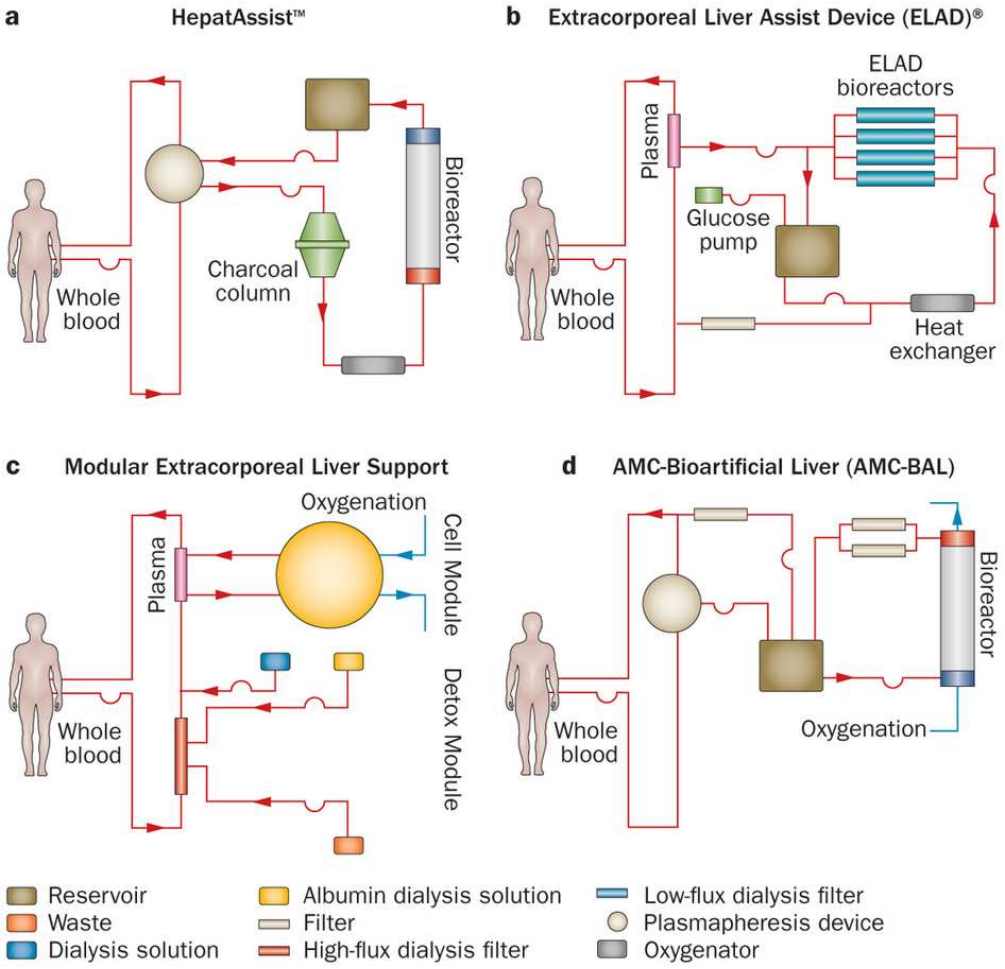


Figure 28: Exemples de circulations extracorporelles ayant été testées en clinique [49]

Les dispositifs intègrent quasiment tous dans leur circuit un réservoir de plasma pour obtenir une compliance et limiter ainsi la pression due au débit important dans la circulation. Dans le circuit de l'Hepatassist, un composant de détoxification purement artificiel est présent (hémoperfusion au charbon actif). L'AMC utilise quant à lui une dialyse à l'albumine. La recirculation du plasma est une option choisie par beaucoup de systèmes (ELAD (Extracorporeal Liver Assist Device), AMC). Un circuit, l'ELAD, a choisi d'ajouter une infusion de glucose pour pallier aux besoins énergétiques des cellules. Enfin, certains circuits incorporent des filtres pour éviter le relargage de cellules ou de particules jusqu'au patient.

I.5.3 Etude sélective de quelques systèmes bioartificiels

Un grand nombre de foies bioartificiels ont été développés depuis environ 30 ans. La majorité de ceux qui ont pu être testés en clinique intègrent des bioréacteurs à fibres creuses, utilisent des cellules primaires de porcs, sont perfusés par du plasma, ont au minimum 10 milliards de cellules et incluent une oxygénation et quelquefois une détoxification artificielle. Les résultats des études cliniques sont mitigés. Bien qu'il ait dans certain cas une détoxification efficace (élimination importante de la bilirubine et de l'ammoniac) ainsi que des améliorations neurologiques aient été observées. Un seul dispositif, l'Hepatassist, a pu prouver une augmentation de la survie des patients dans des sous-groupes. C'est aussi le seul système à avoir pu être expérimenté sur un grand nombre de patients.

L'objectif de cette section est de présenter plus en détails quelques systèmes bioartificiels. Certains ont en effet attiré notre attention en raison de leur état d'avancement (systèmes ayant déjà été testés en préclinique ou en clinique) et de leurs similarités avec notre dispositif (systèmes utilisant l'encapsulation de cellules dans des billes de biopolymère ou des cellules sous forme de sphéroïdes).

I.5.3.1 Systèmes bioartificiels testés en clinique

Parmi les systèmes ayant été testés en clinique deux systèmes vont être étudiés plus en détail : le système ELAD et le système Hepatassist car ce sont ceux pour lesquels nous avons a le plus recul.

I.5.3.1.1 ELAD (Extracorporeal Liver Assist Device)

Le système ELAD (développé par la compagnie Vital Therapies) a été le premier dispositif à incorporer des cellules humaines de lignées. Les cellules C3A (4x50-100g) sont ensemencées dans l'espace extracapillaire d'un hémodialyseur.

Le dispositif a été d'abord utilisé sur du sang total puis la perfusion par du plasma s'est imposée pour éviter des problèmes de coagulation. L'anticoagulation est réalisée à l'héparine. Au niveau du circuit extracorporel, on trouve un plasmafiltre et un réservoir de plasma de 200mL. Une recirculation permet de perfuser quatre bioréacteurs à l'aide d'une pompe centrifuge. Un oxygénateur, dans la boucle secondaire, permet d'alimenter les cellules en oxygène. Les bioréacteurs, le réservoir et l'oxygénateur sont maintenus à 37°C par un dispositif de chauffage (le sang est lui aussi réchauffé au niveau du retour au patient). Une pompe annexe vient infuser du glucose pour répondre aux besoins énergétiques des cellules. Enfin, un filtre empêche le retour éventuel de cellules dans la circulation du patient (cf. figure 29). Le circuit est doté de détecteurs et d'un système de contrôle permettant la génération d'alarmes (détection d'air dans le sang, mesure des pressions du circuit, analyse des gaz du sang, débitmètre…) (cf. figure 30).

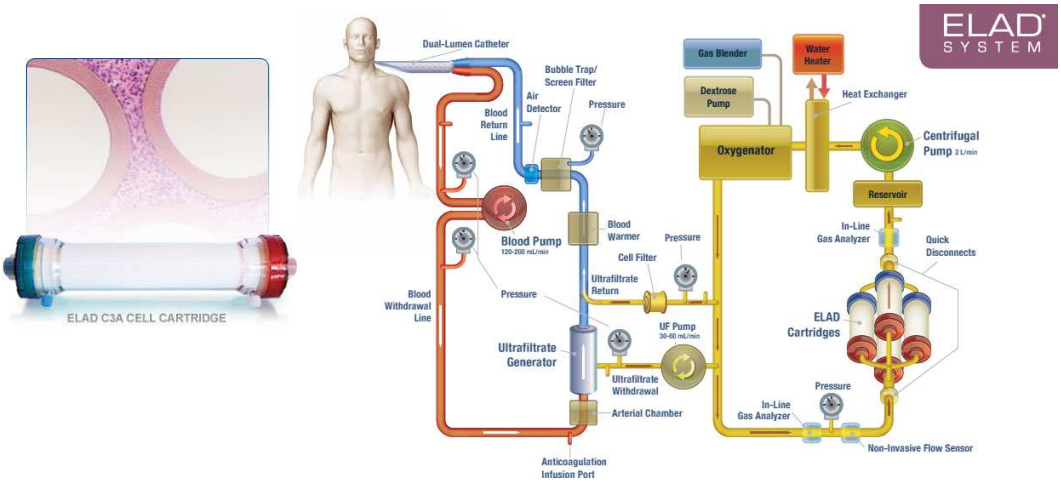


Figure 29: De gauche à droite : Bioréacteur et Schéma de la circulation extracorporelle de l'ELAD (Vital Therapies)

Figure 30: Machine ELAD (Vital Therapies)

Une publication datant de 2002 relate les capacités métaboliques du bioréacteur ELAD lors d'essais préopératoires. Les 4 bioréacteurs (contenant 100g de C3A chacun) ont été utilisés *in vitro* pendant 15 jours avec le circuit complet (oxygénation, complémentation en glucose…) avec du milieu de culture. La production d'albumine (~10mg/heure/ELAD), de transferrine, d'alpha foetoprotéine et de monoethylglycinexylidide a été suivie, ainsi que la consommation de glucose (~625mg/heure/ELAD) et de galactose [50].

Concernant les essais cliniques, le dispositif est actuellement en phase III (avant dernière étape avant la mise sur le marché). La phase I a déjà montré la tolérance et l'absence d'effets indésirables, la phase II une certaine efficacité du dispositif et la phase III vise à faire une étude comparative de l'efficacité du système par rapport à celle d'un traitement standard.

En phase I, 11 patients (10 atteints d'hépatite fulminante) ont été traités avec ELAD. La durée maximale du traitement a été de 58 h. Des problèmes de coagulation sont survenus. 4 patients ont survécu jusqu'à la transplantation, 6 sont décédés et 1 n'a pas eu besoin de transplantation. Un cas d'hypotension a été rapidement solutionné par administration de fluides de substitution [51].

En phase II, 24 patients, divisés en deux groupes (groupe I (n=17) : patients avec une hépatite et supposés avoir de grandes chances de rétablissement spontané, groupe II (n=7) : patients destinés à être transplantés, ont été randomisés pour suivre soit un traitement standard (contrôle) soit un traitement avec ELAD. Les taux de suivi ont été dans le groupe I de 78 et 75% et dans le groupe II de 25 et 33% pour le contrôle et ELAD respectivement. Des bénéfices liés à l'ELAD semblent être visibles pour l'encéphalopathie mais aucune amélioration n'est observée en ce qui concerne la fonction rénale. Une augmentation des taux d'ammoniac (8%) et de bilirubine (20%) est observée par rapport aux valeurs avant traitement [52].

Plus récemment, une étude a été faite sur 5 patients avec une version légèrement modifiée de ELAD. Le seuil de coupure du plasmafiltre est passé de 70 à 120 kDa. 4 cartouches de 100g de cellules au lieu de 50g ont été utilisées. Le débit de perfusion des cartouches a été augmenté de 200 à 500 mL/min. L'oxygène et le glucose sont monitorés fréquemment pour suivre l'activité cellulaire. Sur les 5 patients (tous candidats à une transplantation), traités de 12 à 107h, 4 ont survécu jusqu'à la greffe. Un patient est décédé 2 jours avant sa greffe à cause d'une infection et d'une détérioration de son statut neurologique. Pour des patients de moins de 40 kg seules 2 cartouches sont utilisées. Un dispositif peut être utilisé en continu pendant 40 heures [50].

I.5.3.1.2 Hepatassist

Le système Hepatassist, initialement développé par la société Circe Biomedical, contient des cellules cryopréservées de porcs (50g) ensemencées sur des microsupports dans la partie extracapillaire d'un bioréacteur à fibres creuses. Le circuit du Hepatassist comprend une recirculation de plasma qui perfuse une colonne de charbon actif, un oxygénateur/réchauffeur et le bioréacteur. Du plasma est stocké dans un réservoir. Le circuit est fait pour être associé à des dispositifs déjà commercialisés en ce qui concerne la plasmaphérèse et le chauffage (cf. figure 31).

En phase I, 10 patients ont été traités. 8 patients ont été transplantés avec succès et deux sont décédés sans transplantation. 6 patients dans un coma profond avec œdème cérébral et hypertension intracrânienne ont vu leur pression intracrânienne rapidement normalisée. Le taux d'ammoniac sanguin a diminué de 36% en moyenne. Le taux de bilirubine a diminué de 11% en moyenne [53].

Dans une autre étude de phase II, 39 patients divisés en 3 groupes : groupe I (n=26) patients candidats à une transplantation, groupe II (n=3) patients greffés qui ont subi un rejet et groupe III (n=10) patients non candidats à la transplantation.

Dans le groupe I, 69% ont été transplantés avec succès, 23 % se sont remis sans greffe grâce au traitement du foie bioartificiel et 8 % ont été supprimés de la liste d'attente de greffe du fait de leur rétablissement grâce au traitement mais sont finalement décédés par la suite. Dans le groupe II tous les patients ont survécu jusqu'à la transplantation et se sont correctement rétablis. Dans le groupe III, 80% des patients sont décédés après traitement. Cependant, le traitement à l'Hepatassist a été associé à une amélioration du statut neurologique et dans tous les groupes à une amélioration des paramètres biochimiques (diminution d'environ 18% du taux de bilirubine et d'ammoniac dans le groupe I). Le foie bioartificiel est bien toléré (pas de problèmes liés à l'origine porcine des cellules). Seul un cas d'hypotension a été relevé [54].

Hepatassist a été testé avec la plus grande étude clinique jamais réalisée sur un foie bioartificiel (171 patients) lors d'un essai de phase II/III. Cette dernière étude a été réalisée avec une avec randomisation (un bras avec le traitement de l'Hepatassist et un contrôle avec un traitement standard). Chaque traitement a duré 6 à 7h. La survie à 30 jours a été de 71% pour l'Hepatassist contre 68% pour le contrôle [55]. Cette dernière étude n'a pas réellement montré l'efficacité du dispositif. Hepatassist a été racheté par la société Alliqua et il est maintenant connu sous le nom d'HepaMate. Des développements sont en cours pour améliorer le dispositif et des financements sont à trouver pour lancer une nouvelle étude de phase III. Cependant, aucune information récente n'a été fournie par l'entreprise quant à la poursuite du projet.

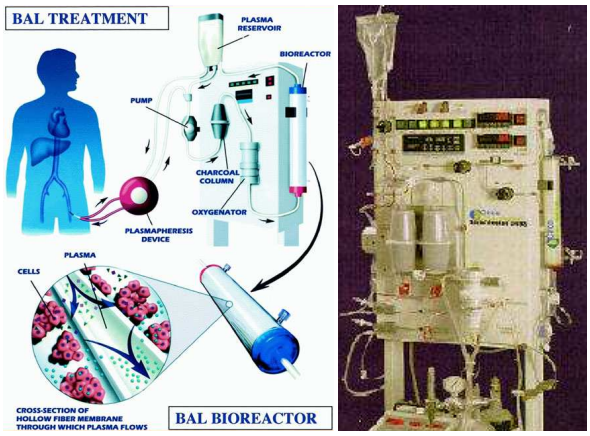


Figure 31: De gauche à droite : Schéma de la circulation extracorporelle et machine de l'Hepatassist (Circe Biomedical)

I.5.3.2 Systèmes bioartificels testés chez l'animal

Des dispositifs bioartificiels utilisant l'encapsulation ou la fluidisation ont déjà été testés chez l'animal. Trois foies bioartificiels sont présentés ici, le Life Liver développé par une équipe coréenne, le Fluidized Bed Bioartificial Liver (FBBL) développé par une équipe anglaise, en collaboration avec notre équipe et le Spheroids Reservoir Bioartificial Liver (SRBL) qui utilise une perfusion directe d'une suspension de sphéroïdes.

I.5.3.2.1 Life Liver

Le système Life Liver utilise des cellules porcines sous forme de sphéroïdes (70 microns) encapsulées dans des billes d'alginate de 800 microns. Un test préclinique a montré une réduction du taux d'ammoniac et une augmentation de la survie des animaux traités [56].

Une étude clinique de phase I est en cours avec une machine développée spécialement pour le dispositif (cf. figure 32). Un premier patient a été traité en 2014.

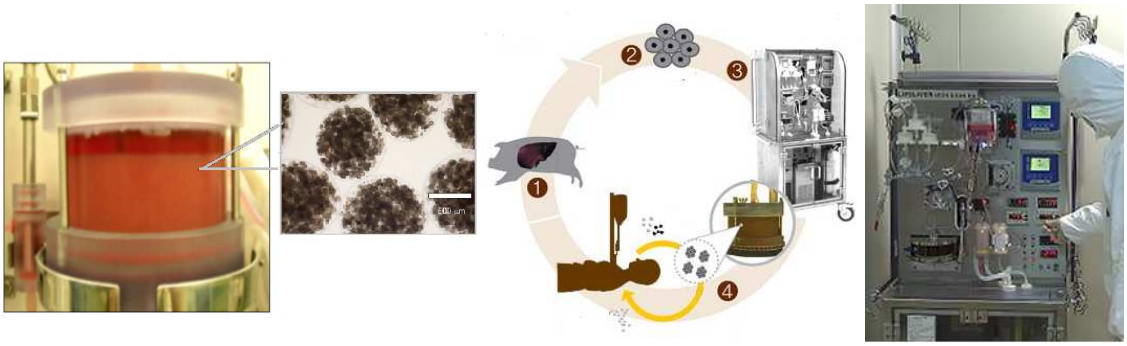


Figure 32: De gauche à droite : Bioréacteur, principe de fonctionnement et machine du foie bioartificiel (Life Liver)

I.5.3.2.2 FBBL (Fluidized Bed Bioartificial Liver)

Initialement créé à l'Université de Technologie de Compiègne [57], le Fluidized Bed Bioreactor a ensuite été intégré dans une circulation extracorporelle grâce aux travaux de Selden et al.

Depuis 1999, l'UMR CNRS7338 (équipe C. Legallais) travaille à la conception et à la validation d'un bioréacteur à lit fluidisé. Il a été développé au cours de doctorats successifs [58] [59] [60] et a déjà été testé à petite échelle avec des cellules humaines de la lignée HepG2-C3A notamment dans le but de caractériser le transfert de masse, les propriétés mécaniques des billes d'alginate et les activités cellulaires sur des durées assez courtes. Des travaux à grande échelle ont également été réalisés pour explorer les aspects hydrodynamiques du lit fluidisé en vue d'une conception optimale du bioréacteur (cf. figure 33). Dès 1999, un premier essai préclinique effectué chez un modèle de porcs en insuffisance hépatique avec des cellules primaires porcines d'une équipe INSERM Rennes et en collaboration avec l'Université de Technologie de Compiègne avait montré une réduction de la pression intracrânienne et de l'ammoniémie [61]. Cependant, le bioréacteur à échelle humaine conçu pour ces expérimentations n'était pas adapté à une circulation extracorporelle du fait de sa taille et de son volume mort. De plus, la fluidisation dans du plasma à générer des problèmes de comportement des billes d'alginate (flottaison).

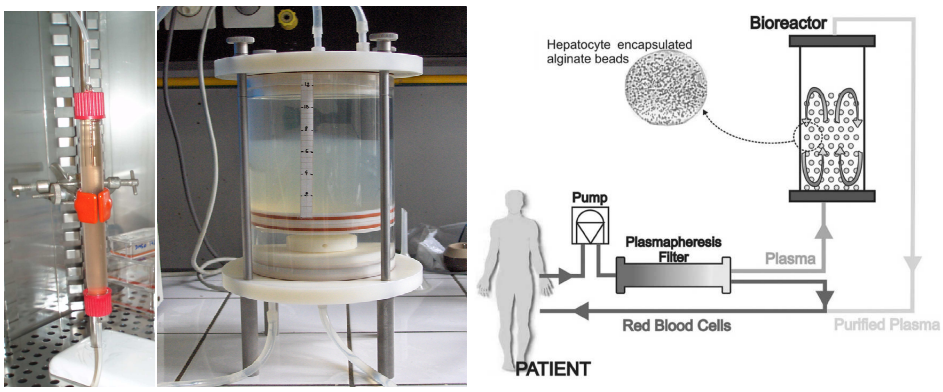


Figure 33: De gauche à droite : Bioréacteur à petite échelle, à grande échelle et schéma du fonctionnement du foie bioartificiel à lit fluidisé conçu à l'UTC

Sur le plan de l'encapsulation, des travaux récents ont visé à optimiser le choix de l'alginate (type et concentration) [62] et ont étudié l'apport potentiel de différents éléments biochimiques lors de la phase d'encapsulation sur la viabilité et les fonctionnalités cellulaires [63]. Ces derniers ont permis de retenir, pour les cellules C3A, l'usage d'un alginate de faible viscosité à une concentration de l'ordre de 2%, sans ajout d'autres éléments, comme meilleur compromis entre activités biologiques et transferts de masse.

D'autre part, une étude a été faite par l'équipe de Selden et al. avec du plasma humain de patients en insuffisance hépatique et de patients sains [64]. Des cellules de la lignée HepG2 sont utilisées sous forme d'agrégats obtenus par une prolifération des cellules au sein des billes d'alginate. Les cellules sont ensemencées à $1,5.10^6$ de cellules par ml d'alginate et avec 20mg/ml de microparticules de verre (pour alourdir les billes). Avant l'utilisation des cellules en lit fluidisé, une phase de prolifération de 8 jours a été assurée en culture dynamique. Un volume de 70 ml de billes contenant $1,5.10^9$ de cellules a été fluidisé dans 300ml de plasma humain pendant 8h à 48ml/min. Le bioréacteur utilisé faisait 12 cm de hauteur et 5 cm de diamètre (certaines expériences ont été faites à l'échelle $1/10^{ème}$). La viabilité des cellules est bonne même lors d'une perfusion de plasma pathologique et il a été observé, une augmentation de la bilirubine conjuguée et une baisse de la bilirubine non conjuguée due à la présence des cellules. Dans cette même étude, une comparaison a été faite entre la lignée HepG2 transfectée ou non pour les gènes des enzymes arginase I et ornithine carbamoyltransférase. Le taux d'albumine produit est, dans les deux cas, d'environ 100 ng/million de cellules/h. La production d'urée à partir d'ammoniac est d'environ 0,2 ng/million de cellules/h pour les cellules HepG2 alors que la lignée transfectée en produit près de dix fois plus.

Une étude, datant de 2013, s'intéresse aux caractéristiques des cellules cultivées en lit fluidisé avec du milieu de culture lors d'une phase de prolifération [65]. Les hépatocytes HepG2 sont ensemencés à une densité de $1,5\text{-}1,75.10^6$ de cellules par ml d'alginate Sigma à 2% avec des microparticules de verre de 10 à 50 microns à 17,5 mg/ml. La prolifération permet d'obtenir 1100ml de billes avec 40 à 50.10^6 de cellules après 11 à 13 jours. Le milieu est changé tous les deux jours et une perfusion de glucose à 24mM est mise en place. 10% de plasma humain est ajouté au milieu à la place du sérum de veau fœtal. Une supplémentation de 5 acides aminés est réalisée (phénylalanine, cystéine, leucine, isoleucine et méthionine). De l'oxygène est apporté directement dans le bioréacteur pour assurer un taux entre 15 et 35% de saturation. Un protocole de conservation à la perfluorodécaline (molécule qui peut dissoudre une grande quantité d'oxygène) et aux antioxydants a été mis au point pour un stockage à température ambiante pendant 48h qui maintient la viabilité initiale des cellules. Les résultats montrent que les cellules expriment un panel d'enzymes de détoxification. Leur consommation de glucose est aux alentours de 25 µg/million de cellules/heure et celle d'oxygène aux alentours de 0,038 nmol/seconde/million de cellules.

Le circuit extracorporel de ce foie bioartificiel repose sur une plasmaphérèse monitorée par la machine commerciale COBE-Spectra (cf. figure 34). Le sang est extrait du patient à un débit de 90 ml/min. Le plasma sort ensuite de la machine à un débit d'environ 45ml/min. Le circuit secondaire comprenant le bioréacteur et un réservoir de plasma permet une perfusion à 400-600ml/min.

Un filtre est placé en amont du retour du plasma dans la circulation générale. Une oxygénation est présente dans le bioréacteur grâce à une conduite poreuse (débit d'oxygène d'1L/min). Les cellules utilisées (4-6.10^{10}) sont encapsulées dans des billes de 500 à 600 microns.

Un processus de conservation, pour le transport des bioréacteurs en chaîne de froid a été développé avec un maintien de la viabilité des hépatocytes pendant 3 jours. Des essais ont été réalisés sur des porcs (20 à 30kg) en insuffisance hépatique sévère (shunt porto-cave et ligature de l'artère hépatique). La durée du traitement a été de 8h. L'étude démontre l'efficacité du système pour l'amélioration des paramètres cliniques tels que la pression intracrânienne, les fonctions de coagulation, la conjugaison de la bilirubine, l'acidose et la synthèse de protéines humaines [66].

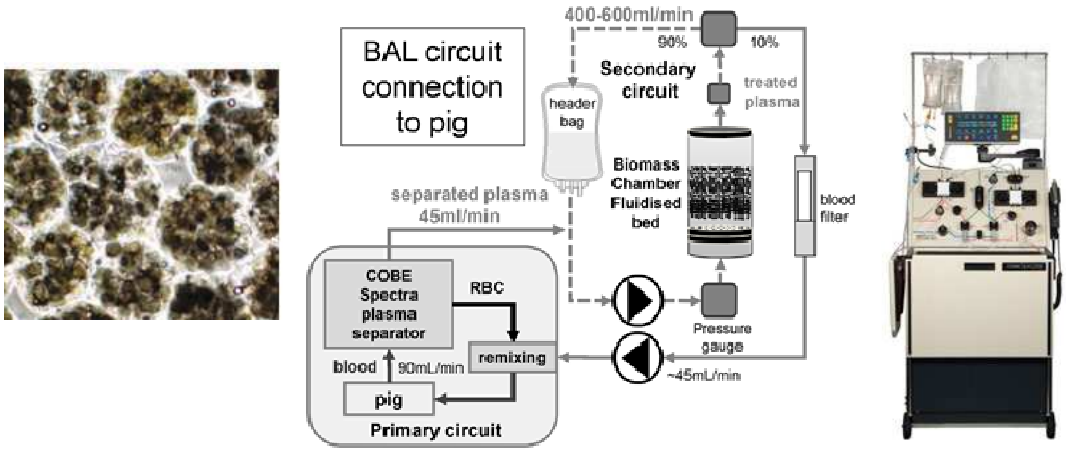


Figure 34: De gauche à droite : Culture de HepG2 dans les billes d'alginate, schéma de la circulation extracorporelle du FBBL et machine COBE Spectra (TerumoBCT) [66]

I.5.3.2.3 SRBL (Spheroids Reservoir Bioartificial Liver)

Ce foie bioartificiel, développé par la Mayo Clinic à Rochester (USA), utilise des cellules porcines sous forme de sphéroïdes (environ 500g de cellules). Ces sphéroïdes sont obtenus et cultivés grâce à un bioréacteur de 2L à oscillations (25 millions de cellules par ml) (cf. figure 35).

La circulation extracorporelle de ce dispositif inclue un filtre à fibres creuses (pour assurer le rôle de barrière immunologique) ainsi qu'une double oxygénation (au niveau de l'atmosphère et d'une membrane perméable du réservoir).

En 2005, des essais ont été faits pendant une durée de 5 jours à petite échelle dans des boites de culture T75 contenant 20ml de milieu (William E supplémenté en sérum de veau fœtal, antibiotiques, insuline, sélénium, transferrine et diazépam). Trois densités cellulaires ont été testées : 1, 5 et 10 millions de cellules par ml (cellules fraîches ou cryopréservées). La production d'albumine des sphéroïdes de cellules fraîches est d'environ 20 ng/heure/million de cellules alors que les sphéroïdes de cellules cryopréservées produisent environ 0,3 ng/heure/million de cellules. Une simulation d'un milieu toxique a été faite par l'ajout de diazépam (médicament de la famille des benzodiazépines) et d'ammoniac (un gaz enrichi en ammoniac marqué a été mis en contact avec le milieu de culture). Le diazépam est rapidement éliminé (8h) et ses métabolites apparaissent dans le milieu (la détoxification est meilleure avec une densité élevée de cellules). L'ammoniac est éliminé de façon plus rapide par les sphéroïdes que lors d'une culture en 2 dimensions. La production d'urée à partir d'ammoniac (40% de la production d'urée) est, au bout d'un jour, d'environ 2 µg/heure/million de cellules pour les sphéroïdes [67].

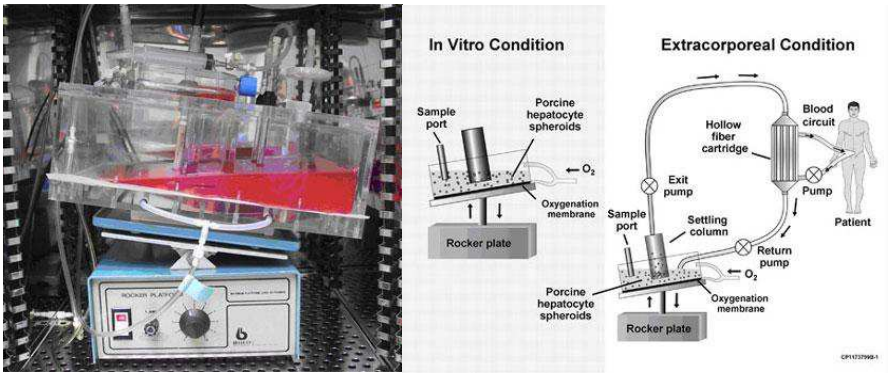


Figure 35: De gauche à droite : Bioréacteur et schéma de la circulation extracorporelle du SRBL (Mayo Clinic) [67]

Le dispositif SRBL a évolué et un nouveau design de bioréacteur a été proposé. La circulation extracorporelle s'est aussi complexifiée pour intégrer des composantes artificielles (dialyse, cartouches d'adsorption…) (cf. figure 36). Ce nouveau foie bioartificiel a été testé en 2015 au cours d'une évaluation préclinique sur un modèle porcin d'insuffisance hépatique médicamenteuse. L'étude a montré des améliorations de la suivie sur les 18 animaux testés deux jours après l'apparition des symptômes de l'insuffisance hépatique (83% avec traitement avec un système avec cellules, 17% avec un traitement avec un système sans cellules et 0% avec un traitement standard seul). Des améliorations de l'ammoniémie et neurologiques ont aussi été observées. Les sphéroïdes ont maintenus un taux de consommation d'oxygène stable synonyme d'une activité maintenue au cours du traitement [68].

En parallèle, l'équipe travaille aussi sur l'expansion d'hépatocytes humains dans un modèle porcin.

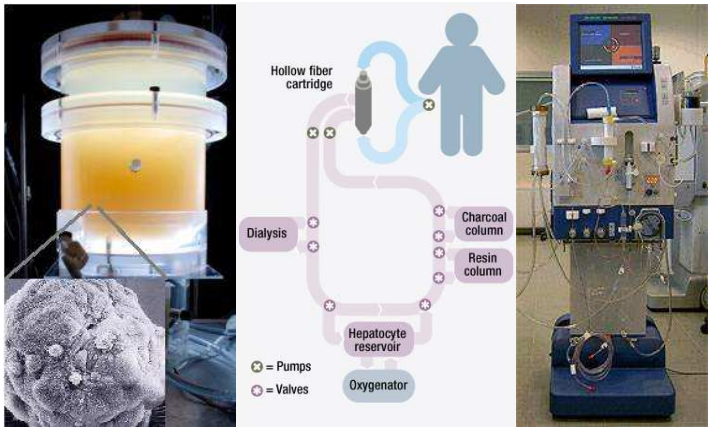


Figure 36: De gauche à droite : Bioréacteur, schéma de la circulation extracorporelle et machine du SRBL (Mayo Clinic)

I.5.3.3 Systèmes testés in vitro

D'autres foies bioartificiels basés sur l'encapsulation de cellules ou sur la culture de sphéroïdes sont en cours de développement. Parmi eux trois bioréacteurs vont être présentés par la suite : le Choanoid Fluidized Bed Bioreactor (CFBB), un foie bioartificiel avec un design de lit fixe et le Hybrid-MDS (Microsphere-based Detoxification System).

I.5.3.3.1 Le CFFB (Choanoid Fluidized bed Bioreactor)

Ce bioréacteur est constitué de cellules immortalisées (HepLi4) et encapsulées dans des billes d'alginate (1,8%) et de Chitosan d'un diamètre de 500 à 600 microns (2.10^6 cellules par ml).

Une culture de 2 semaines dans un spinner (culture dynamique par agitation rotative) permet d'atteindre la productivité optimale des cellules. Le bioréacteur contient 400ml de billes avec $5.\ 10^9$ cellules dans un volume de 500ml (cf. figure 37). Des essais ont été fait avec du milieu de culture (DMEM) et avec du plasma de patients en insuffisance hépatique dilué dans du liquide physiologique. Le taux d'albumine produit en fluidisation dans du milieu de culture est aux alentours de 4µg/heure/million de cellules.

Une toxicité du plasma pathologique est observée par une baisse de la viabilité des cellules après 6h de perfusion et par une étude histologique [69].

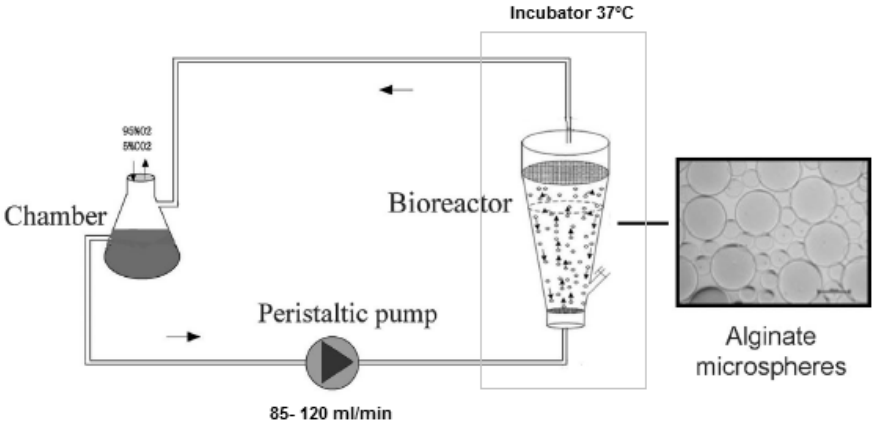


Figure 37: Schéma du fonctionnement du foie bioartificiel CFBB [70]

I.5.3.3.2 Bioréacteur à lit fixe

Dans une étude de 2012, un design de foie bioartificiel à lit fixe a été testé avec une encapsulation de cellules isolées de rat à une densité de 12 millions de cellules par ml d'alginate (cf. figure 38). Le bioréacteur, d'un volume de 16 ml, est perfusé avec un débit de 16 ml par minute. Lors des essais réalisés sur ce bioréacteur, un circuit de chauffage et un apport d'oxygène étaient présents (Un flux d' 1L/min d'oxygène à 95% dans le réservoir de milieu crée une atmosphère enrichie à 30 % d'oxygène). La consommation d'oxygène a été mesurée et se situe aux alentours de 0,2 nmol/million de cellules/s. Le cytosquelette des cellules a été observé par microscopie confocale. Les cellules retrouvent une polarité, des jonctions cellulaires et des canalicules biliaires au bout de 6h de perfusion. Aucune analyse métabolique n'est relatée [71].

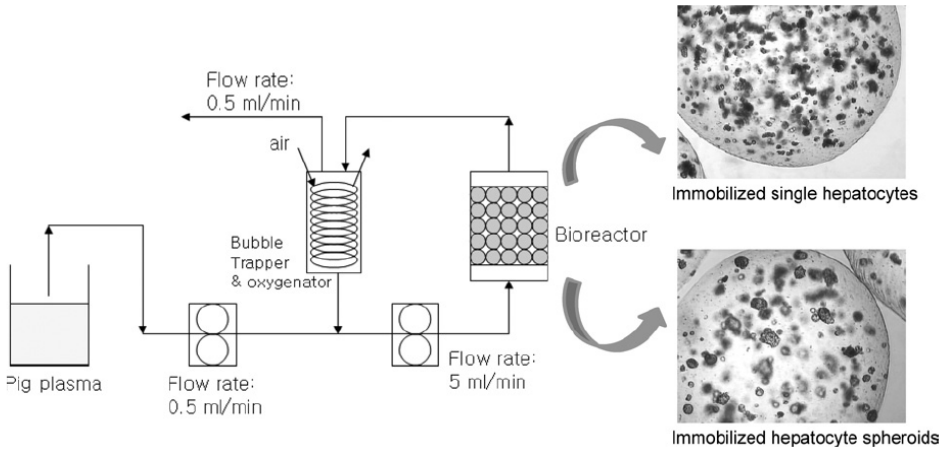


Figure 38: Schéma du fonctionnement d'un foie bioartificiel en lit tassé [71]

I.5.3.3.3 Le Hybrid-MDS

Le dispositif Hybrid-MDS comporte un circuit sang et un circuit plasmatique (cf. figure 39). Le sang est prélevé au patient à l'aide d'une pompe (A) et le plasma est séparé grâce à un plasmafiltre (C). Le plasma recircule à 600mL/min dans un circuit secondaire (Filtrate circuit) dans lequel circulent des microbilles d'alginate (F) et des microbilles adsorbantes (1-10 microns) (G). Pour éviter la dégradation des billes, la recirculation est assurée par à une pompe centrifuge (B). Le plasma est oxygéné grâce à un dispositif à fibres creuses. Le sang passe par un filtre (D) de dialyse pour éviter que d'éventuels débris ne passent dans la circulation sanguine du patient.

Le système utilise des cellules issues de lignée (C3A). Les billes ont une grande stabilité mécanique et résistent à un flux de 600ml/min car elles sont fabriquées avec un mélange d'alginate de viscosité faible (0,8%), de 10 mM d'acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique et de 0,85% de Na Cl. Un coating est fait avec du A-pDADMAC puis du pSS. Le seuil de coupure est entre 66 et 130 kDa ce qui permet le passage de l'albumine. L'encapsulation se passe entre 4 et 10°C à une densité de 1 million de cellules par ml d'alginate. Les billes ont un diamètre très petit (80 microns) ce qui permet de maximiser les échanges et de minimiser le volume mort. Pour 100mL de volume de billes, on a tout de même un volume de 330mL de circuit secondaire. Le système contient environ 10^6 cellules. Les cellules sont cultivées dans du MEM (10% SVF, glutamine, P/S, NEAA, pyruvate et bicarbonate). Les billes sont ensuite cultivées dans du milieu sans sérum pendant 6 jours en statique. Pour des essais de culture en dynamique, 12ml de billes sont utilisés pour un volume total du circuit de 120 ml pendant 24h. La production d'urée est de 14 µg/heure/million de cellules. La consommation de glucose est de 50 µg/heure/million de cellules [72].

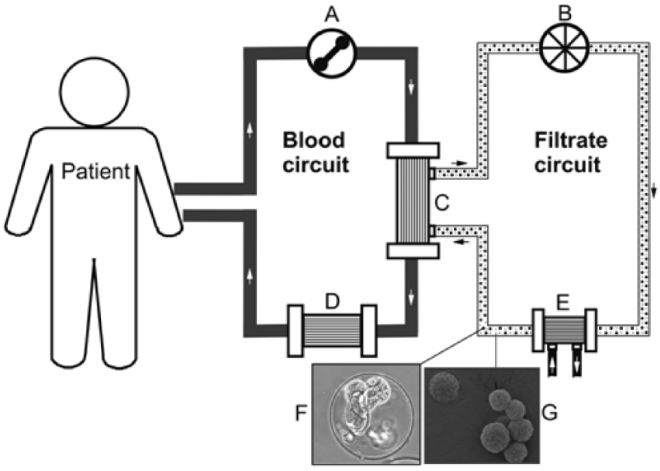


Figure 39: Schéma de la circulation extracorporelle du Hybrid-MDS [72]

I.5.3.4 Synthèse

Le tableau suivant récapitule quelques données importantes concernant les foies bioartificiels présentés dans cette section (cf. tableau3).

Tableau 3: Tableau récapitulatif des différents foies bioartificiels étudiés

Nom	Type de bioréacteur	Type cellulaire et nombre de cellules	Détoxification Artificielle	Oxygénation et consommation en oxygène des cellules	Production Albumine
ELAD	Fibres creuses	C3A 200-400g	-	Oxygénateur	10mg/ELAD/h
Hepatassist	Fibres creuses	Cellules porcines $5\text{-}7.10^{9}$	Charbon actif	Oxygénateur	-
Life Liver	Lit fluidisé	Sphéroïdes porcins encapsulés	-	-	-
FBBL	Lit fluidisé	HepG2 encapsulés $4\text{-}6.10^{10}$ 40-50M/ml	-	Conduite poreuse 0,038nmol/M/sec	100ng/M/h (soit 4-6mg/h pour le système entier)
CFFB	Lit fluidisé	HepLi4 5.10^{9}	-	-	4µg/M/h
-	Lit fixe	Cellules de rat encapsulées 12M/ml	-	Oxygénation du réservoir 0,2nmol/M/sec	-
Hybrid-MDS	-	C3A encapsulées 1M/ml	Billes adsorbantes	Oxygénateur	-
SRBL	Réservoir	Sphéroïdes de cellules porcines 500g	Charbon actif Résine Dialyse	Oxygénateur	20ng/M/h

I.5.4 Aspects réglementaires

Au-delà des aspects liés à la fonctionnalité des dispositifs, le développement des foies bioartificiels est aussi conditionné par des aspects réglementaires. Du fait de leur caractère innovant, ce type de thérapies reposant sur l'ingénierie tissulaire n'a été que très récemment encadré par la réglementation française et européenne avec des contraintes très fortes.

Un foie bioartificiel est une combinaison d'un dispositif médical (circuit extracorporel) et d'un médicament (bioingénierie). L'ensemble du dispositif est donc considéré comme un MTI (médicament de thérapie innovante) ou encore appelé ATMP (Advanced Therapies Medical Product) [73].

Les « Advanced Therapies » (dans notre cas « tissue engineered products ») sont réglementées par :

- la réglementation No 1394/2007 [74] qui fait référence principalement à la directive 2001/83/EC [75] (relative à l'usage des médicaments humains), qui a été amendée de
- la 2009/120/EC [76] (spécifie le cas particulier des « Advanced Therapies »),
- et la réglementation No 726/2004 [77] (Agence européenne des médicaments).

L'Union Européenne, au sein de l'EMA (European Medicines Agency) a mis en place un Committee for Advanced Therapy (CAT) qui a pour mission d'évaluer la sécurité, la qualité et l'efficacité de chaque nouvel ATMP, avant toute autorisation de mise sur le marché. A noter que la directive 2001/83/EC concerne uniquement les produits qui vont être mis sur le marché ou qui sont fabriqués de manière industrielle.

Certains dispositifs bénéficient d'un statut particulier (préparation de thérapie cellulaire PTC), moins contraignant que celui de médicament, car les cellules utilisées sont peu modifiées et sont préparées sur place. Les cellules ou tissus sont sous le champ de la bioingénierie si elles ont subi les manipulations précisées dans l'annexe I de la réglementation N°1394/2007. Parmi ces manipulations, sont mentionnées la congélation et la cryopréservation.

Tout le développement des foies bioartificels doit être fait selon les bonnes pratiques, notamment pour la production (conditions GMP). Cela inclut que le biomatériau utilisé soit conforme à la réglementation. L'acide alginique (utilisé pour l'encapsulation des cellules) est un excipient très utilisé et il est par conséquent inscrit dans la pharmacopée européenne [78]. Celle-ci prévoit que les impuretés doivent être signalées, les limites admissibles indiquées et qu'une procédure d'analyse appropriée doit être réalisée. Les standards ASTM F2064 et F2315-11 [79] [80] donnent des conseils de vigilance en ce qui concerne la caractérisation de l'alginate (impuretés, stabilité, stérilisation et biocompatibilité). Il est fait référence à l'ISO 10993 sur l'évaluation des dispositifs médicaux [81].

De même, tous les produits thérapeutiques annexes (produits entrant en contact avec les cellules au cours de leur préparation, transformation, conservation, conditionnement et transport avant leur utilisation chez le patient) doivent être autorisés. Une liste des produits permis est publiée sur le site web de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) [82].

En ce qui concerne la composante « dispositif médical », les logiciels permettant le contrôle des circulations extracorporelles et la gestion des alarmes sont eux aussi soumis à réglementation selon les normes NF EN 62304 et NF EN 62366 [83] [84].

I.6 POSITIONNEMENT DU PROJET SUPPLIVER

Les foies bioartificiels développés jusqu'à présent ont montré à la fois des éléments prometteurs et des limites. Leur analyse permet d'affiner des voies de recherche et développement pour les futurs systèmes. C'est ce que propose le projet SUPPLIVER, dans lequel s'inscrit mon doctorat, dans la continuité des travaux déjà entrepris à l'UTC sur le foie bioartificiel à lit fluidisé.

Ce projet SUPPLIVER est porté par l'UTC avec un consortium, de partenaires universitaires et industriels et est financé par le programme TecSan 2011 de l'Agence Nationale de la Recherche (cf. figure 40).

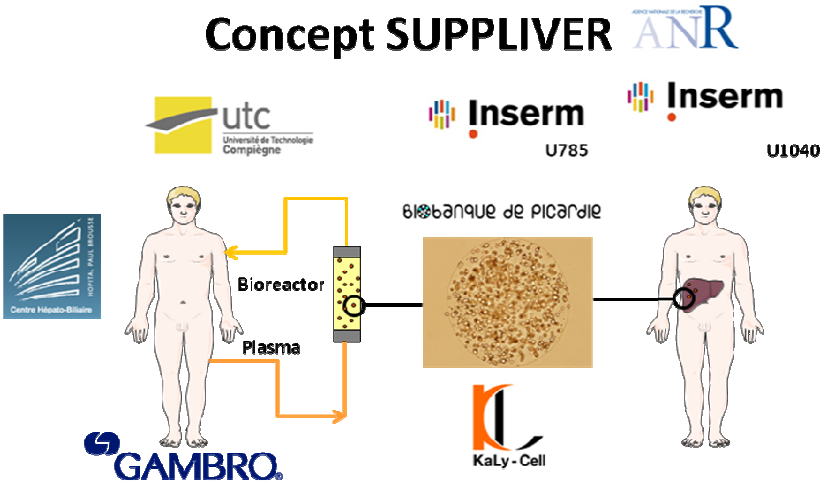


Figure 40: Schéma global du projet SUPPLIVER incluant les partenaires du consortium

L'originalité de ce projet provient du choix d'encapsuler des cellules humaines primaires (type cellulaire de référence) dans une structure sphérique et poreuse (billes d'alginate) et de les cryopréserver pour un stockage sur le long terme. Cette partie du projet est menée par l'ensemble des partenaires qui apportent leurs compétences propres (bioingénierie, biomatériaux, biologie cellulaire, congélation). A travers cette approche, il est envisageable de disposer d'un nombre suffisant d'hépatocytes humains encapsulés, prêts à être utilisés. Les cellules encapsulées pourront alors être mises en contact avec le plasma du patient dans un bioréacteur à lit fluidisé qui permet d'optimiser les transferts de matière et les fonctions du tissu reconstruit.

Ce bioréacteur sera inclus dans une circulation extracorporelle complète pilotée par un dispositif médical dont la base (système PrismaFlex^{TM}, Gambro) est déjà largement diffusée dans les services de réanimation.

Une étude sur l'animal a été prévue pour valider le concept. Une partie annexe du projet vise à implanter les hépatocytes encapsulés directement chez l'animal. L'ensemble des développements doit être surveillé d'un point de vue réglementaire pour s'assurer que les bonnes pratiques soient respectées. En effet, une des retombées du projet est de préparer de futurs essais cliniques. Pour le mener à bien, le programme a été découpé en différentes tâches qui sont très souvent interdépendantes (Fig. 41).

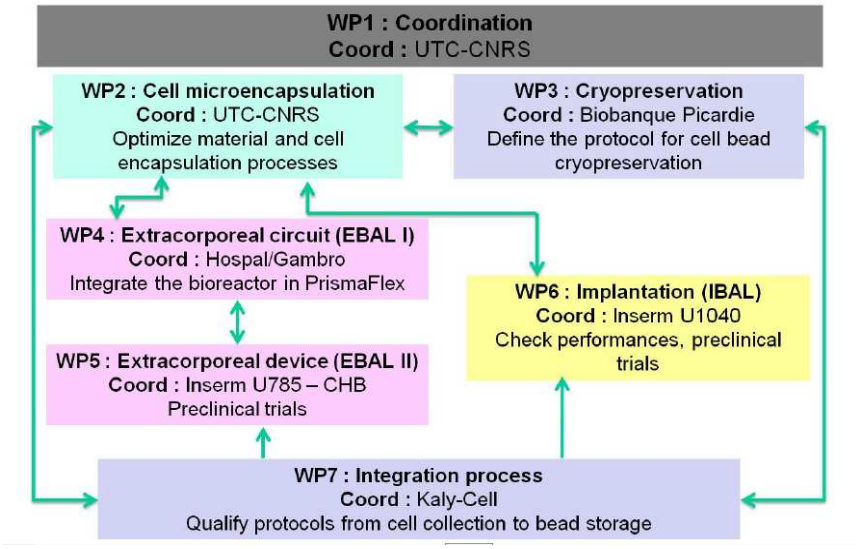


Figure 41: Schéma récapitulatif du projet SUPPLIVER

Dans mon doctorat CIFRE, réalisé en collaboration entre la société Gambro et l'UTC, je me suis plus particulièrement intéressée aux étapes de microencapsulation de cellules (WP2), de conception et d'intégration du bioréacteur à un circuit extracorporel (WP4) pour mener à bien de premiers essais précliniques (WP5). Cette position m'a permis d'avoir une vue globale de l'ensemble du projet et d'interagir avec les différents partenaires.

Dans le manuscrit, après une introduction à la suppléance hépatique (Chapitre I) et une présentation des matériels et méthodes utilisés (Chapitre II), trois chapitres de résultats sont présentés.

Le chapitre III est consacré à l'optimisation du bioréacteur à lit fluidisé en se focalisant sur la problématique du passage de l'échelle du laboratoire (bien maitrisée) à celle du traitement (échelle humaine). Il faut ainsi prendre en compte le maintien de conditions optimisées de fluidisation pour des billes d'alginate utilisées dans du plasma pathologique.

Afin d'améliorer la fonctionnalité des cellules, il a été décidé au sein du consortium de les cultiver sous forme de sphéroïdes. Dans mon projet, j'ai employé la lignée de cellules hépatiques C3A pour ne pas dépendre de l'étape de mise au point sur cellules primaires. Cette phase de culture et l'encapsulation consécutive sont rapportées dans le chapitre III.

Le Chapitre IV traite quant à lui de la conception et de la validation opérationnelle de la circulation extracorporelle complète. Il a été choisi d'intégrer le bioréacteur à lit fluidisé à un circuit réellement hybride en incorporant de nombreux composants artificiels notamment en se basant sur le fonctionnement du système MARS (cf. figure 42) et du traitement d'hémoperfusion (Gambro), afin d'assurer une efficacité optimale des cellules.

Figure 42: Machine Prismaflex et son Add-On MARS (Gambro)

Enfin, le chapitre V est consacré à l'analyse *in vitro* et *in vivo* du système complet, en réalisant des essais préliminaires à grande échelle sans cellules chez l'animal sain (*in vivo*) et avec des cellules cultivées dans du milieu de culture (*in vitro*). Le choix des essais a été guidé par la volonté d'obtenir de premiers résultats concernant la sécurité et fonctionnalité du dispositif..

Le document se termine par des conclusions sur les étapes franchies au bénéfice du projet SUPPLIVER global, qui sera probablement classifié comme un médicament combiné de thérapie innovante (MTI), ainsi que sur les pistes de travaux à mener en vue de la réalisation des essais précliniques complémentaires et des futurs essais cliniques.

CHAPITRE II : **MATERIEL ET METHODES**

DE LA MICROENCAPSULATION AUX ELEMENTS DE LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE

II.1 LA MICROENCAPSULATION

La microencapsulation est utilisée depuis de nombreuses années dans l'industrie. Pour la culture cellulaire, la microencapsulation a pour but d'immobiliser et de protéger un ou plusieurs types cellulaires tout en assurant un transfert de masse avec le milieu extérieur (cf. figure 43). De nombreux matériaux ont été utilisés mais les hydrogels sont ceux qui sont les plus étudiés du fait de leur facilité à former des microbilles. Parmi eux, l'alginate est un des matériaux souvent préféré car il possède une très bonne biocompatibilité.

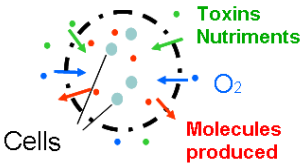


Figure 43: Principe de la détoxification du plasma via les cellules hépatiques encapsulées dans des billes d'alginate

II.1.1 L'alginate

L'alginate ou acide alginique est un polysaccharide issu d'algues brunes couramment employé dans le domaine de la microencapsulation et en pharmaceutique comme excipient. L'acide alginique est formé de deux polymères : le gluluronate et le mannuronate. La proportion de ces deux polymères, qui varie selon l'espèce d'algue, sa position géographique ou son âge, joue sur les propriétés physico-chimiques de l'alginate (cf. figure 44).

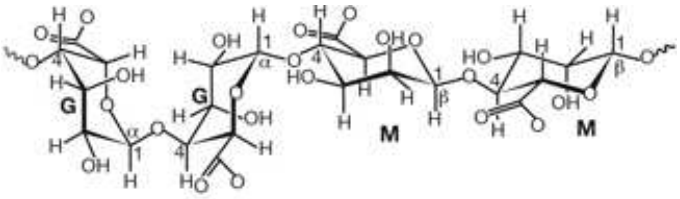


Figure 44: Structure chimique des monomères guluronate (G) et mannuronate (M) de l'alginate [85]

En vue des contraintes réglementaires (cf. I.5.4), l'alginate proposé par la société Sigma de type *Macrocystis pyrifera* utilisé précédemment à l'Université de Technologie de Compiègne a été remplacé par un alginate de qualité pharmaceutique fourni par FMC BioPolymer. Le Manucol LKX est un alginate de viscosité moyenne avec un rapport M/G de 70/30.

II.1.2 Fabrication de billes d'alginate sans cellules

Les billes d'alginates sont fabriquées grâce à la propriété de gélification de l'alginate en présence de calcium (cf. figure 45).

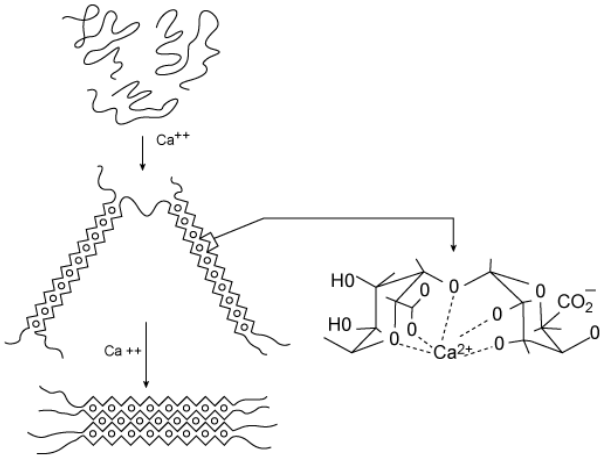


Figure 45: Gélification de l'alginate en présence de calcium [86]

II.1.2.1 Préparation de la solution d'alginate

L'alginate Manucol est utilisé soit à une concentration de 1,3% (pour des essais non stériles) soit à une concentration de 1,5% et filtré pour des essais stériles cf. II.1.3.1) (cf. figure 46).

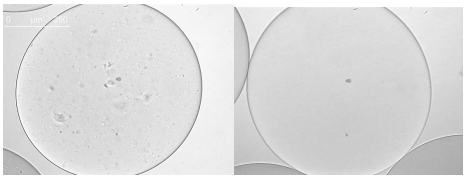


Figure 46: De gauche à droite : Billes de Manucol 1,3% et billes de Manucol filtré 1,5%.

L'alginate en poudre est conservé au réfrigérateur. La mise en solution de l'alginate est faite dans du liquide physiologique (NaCl 154 mM, HEPES 10mM) ou du milieu de culture DMEM (Pan–Biotech).

La proportion d'alginate est quantifiée en fonction du pourcentage en masse par rapport à la masse du solvant utilisé (Pour 1,5%, 0,75g d'alginate dans un tube Falcon de 50ml (50g)).

La poudre est bien répartie dans un tube Falcon pour éviter les amas difficiles à solubiliser. Les tubes sont mis sous agitation pendant 24h à température ambiante ou à 4°C pendant 48h jusqu'à qu'il y ait une dilution complète de la poudre en une solution visqueuse homogène.

Pour augmenter la masse volumique des billes, des microparticules de verre sphériques de 10-50 microns de diamètre peuvent être ajouté à l'alginate (PGB-05 de Kisker). L'ajout de microparticules de verre se fait après l'homogénéisation complète de la solution.

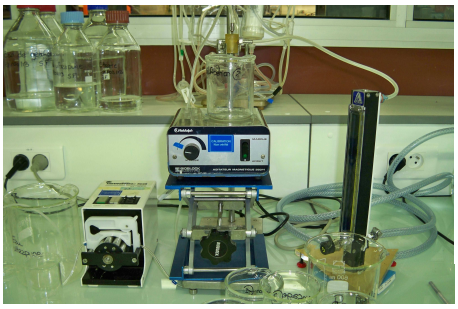
Pour colorer les billes, du rouge de Nylosane peut être ajouté à 10% (cf. figure 47).

Figure 47: Billes colorées au rouge de Nylosane

II.1.2.2 Fabrication des billes

Pour obtenir des billes de 850 à 900 microns de diamètre, l'alginate sous forme liquide est propulsé sous un débit de l'ordre de 10 ml/min au travers d'une buse d'un diamètre qui peut varier entre 200 et 400 µm, par un pousse seringue (KD Scientific) ou une pompe péristaltique (Ismatec) lorsqu'il n'y a pas de cellules.

Pour contrôler la taille des billes, deux systèmes sont disponibles au laboratoire. Avec le Home Made System, un flux coaxial d'air à 3,5 L/min vient détacher les gouttelettes d'alginate qui se forment à l'extrémité de la buse de 200 microns (cf. figure 48).



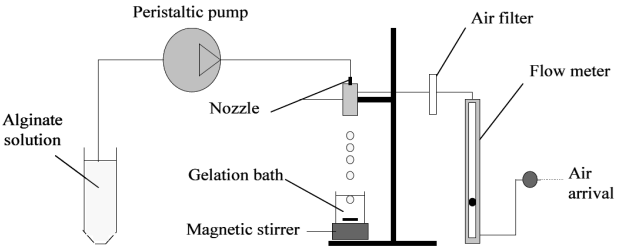


Figure 48: Photo du montage Home Made System utilisé pour la fabrication des billes d'alginate et schéma du dispositif de fabrication des billes d'alginate

Pour une production importante de billes d'alginate, le système d'encapsulation VAR D de l'entreprise Nisco Engineering, Zürich, Suisse) est utilisé. La buse a un diamètre interne de 400 microns et taille des gouttes est alors contrôlée grâce à des vibrations dont les caractéristiques sont à définir en fonction de la taille des billes et de la viscosité de l'alginate. Dans notre cas, la fréquence est de 200Hz et l'amplitude de 100% (cf. figure 49). La taille de la buse étant plus grande que pour le Home Made System, les problèmes de bouchage de la buse sont moins fréquents.

Une plus grande quantité de billes peut donc être produite avec le système Nisco cependant celui-ci est moins pratique d'utilisation et la stérilisation de l'appareil est plus complexe.

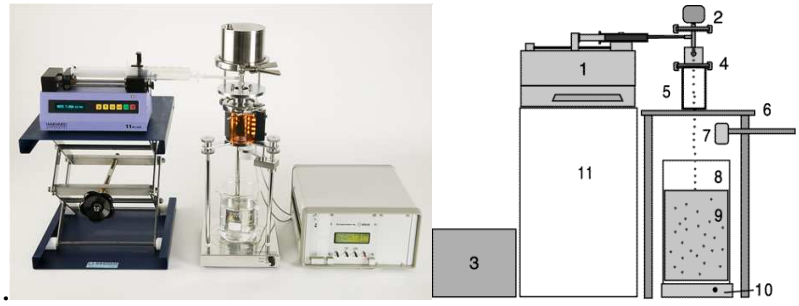


Figure 49: Photo du montage Nisco Var D utilisé pour la fabrication des billes d'alginate et schéma du dispositif de fabrication des billes d'alginate 1-Pousse seringue 2-Vibrateur 3-Unité de contrôle 4-Buse 5-Lumière 6-Support de la buse 7-Récupérateur 8-Bécher de récupération 9-Solution de gélification 10-Agitateur magnétique 11-Support du pousse seringue (Nisco Engineering)

Dans les deux cas, les gouttes d'alginate tombent dans un bécher contenant une solution de gélification (NaCl 154 mM, HEPES 10 mM, CaCl2 115 mM). Après qu'au maximum 25 ml d'alginate ai été prélevé, la fabrication est stoppée. La buse est rincée avec du liquide physiologique pendant deux minutes, une solution « citrate » (NaCl 154 mM, HEPES 10mM, Citrate 55mM) pendant une minute puis à nouveau au liquide physiologique pendant deux minutes. Les billes d'alginate restent 15 minutes dans le bain de gélification avant d'être rincées avec du liquide physiologique (pour des essais non stériles) ou avec du milieu de culture (2 fois 2 minutes). Le processus de gélification établit, par le biais des ions Ca^{2+} des ponts entre les chaines du polymère, ce qui a pour effet de transformer la solution d'alginate en une structure poreuse et donc de diminuer dans un premier temps le volume global observé. Cependant un processus de gonflement peut intervenir rapidement par la suite, lorsque le milieu de conservation est peu riche en calcium. Le volume de billes obtenues dépend donc du volume d'alginate liquide utilisé mais aussi du milieu de conservation [87].

II.1.2.3 Conservation et utilisation des billes d'alginate

Pour des essais en conditions non stériles, les billes peuvent être ensuite conservées sur plusieurs jours dans de l'eau ultra pure à 4°C au réfrigérateur. L'utilisation des billes se fait ensuite dans du Ringer (NaCl 116 mM, HEPES 10 mM, $CaCl_2$ 10mM, KCl 2,9mM). Le Ringer est un liquide physiologique qui contient du calcium ce qui permet ainsi d'éviter un gonflement trop important des billes.

II.1.3 Protocole de bio-encapsulation

L'encapsulation de cellules apporte un certain nombre de modifications au protocole de fabrication des billes. Tout d'abord, les manipulations doivent être mise en œuvre en condition stérile sous hotte à flux laminaire. Cela impose en particulier de stériliser l'alginate.

II.1.3.1 Stérilisation de l'alginate

Un alginate en poudre de qualité pharmaceutique livré stérile est disponible dans le commerce (Pronova) mais le coût augmente très fortement par rapport à l'alginate non stérile (102$ les 0.25g).

La filtration manuelle à l'aide de seringues de 5ml et de filtres adaptés à celle-ci est la méthode classiquement utilisée au laboratoire de l'Université de Technologie de Compiègne (cf. figure 50). Pour limiter l'endommagement des chaines d'alginate, la filtration est réalisée de manière successive avec tout d'abord un filtre de 0,8 microns (en condition non stérile) puis un filtre de 0,45 microns (Millex, Merck Millipore). Cette filtration n'est pas réellement stérilisante mais préserve la culture de toute contamination. Pour une stérilisation complète, une filtration avec un filtre de 0,2 microns est nécessaire. Cette étape n'a pas été réalisée pour les essais présentés ici car il est assez laborieux du fait de l'importante viscosité de l'alginate de le filtrer à ce niveau de porosité.

Figure 50: Stérilisation manuelle de l'alginate par filtration

La technique de stérilisation par filtration est peu adaptée à la production d'un grand volume de billes. Une technique alternative à la vapeur a donc été testée à partir des résultats de Chen et al. [88].

L'alginate Manucol en poudre est autoclavé 110°C pendant 20 minutes puis du milieu de culture DMEM (Pan-Biotech) est ajouté pour une obtenir une concentration finale de 1,5% d'alginate en solution. Une filtration finale à 5 microns élimine les impuretés. Il ne s'agit pas non plus d'une réelle stérilisation puisque la température de l'autoclave est en dessous des 121°C. Une trop forte température risquerait d'abimer trop fortement l'alginate.

II.1.3.2 Encapsulation de cellules

Pour la culture cellulaire la pompe péristaltique a été remplacée par un pousse seringue. Le culot de cellules est obtenu par centrifugation puis mélangé à la solution d'alginate pour bien homogénéiser l'alginate aux cellules et aux microparticules de verre si nécessaire.

Les solutions utilisées pour la fabrication des billes sont stérilisées par filtration à 0,22 microns (Steritop de Merck Millipore). Une fois les billes d'alginate gélifiées celles-ci sont rincées dans du milieu de culture à 37°C (3 fois 5 minutes) pour éliminer le liquide de gélification. Les billes sont ensuite mises en culture en incubateur.

II.1.4 Evaluation des propriétés physiques des billes d'alginate

II.1.4.1 Tests de compression

Les billes ont été soumises à des tests de compression. Cette approche a pour objectif de mesurer la déformation des billes sous un chargement uni-axial.

Il est possible de réaliser l'expérimentation sur une seule bille et donc d'avoir accès aux propriétés mécaniques propres à celle-ci. A chaque essai, une mesure de la déformation de la bille est réalisée (déplacement du piston) en fonction de la force appliquée. Le protocole est le même que celui élaboré par David et al. [89].

Deux bancs expérimentaux sont disponibles au laboratoire, se composant d'une machine de compression sur laquelle est fixée une cuve transparente ou un plateau au centre de laquelle il est possible de disposer la bille (cf. figure 51). Une dizaine de billes par triplicata d'une condition sont soumises au test de compression.

Un piston connecté aux capteurs de force (force max 12N (MTS) 100g (BOSE), précisions de 10^{-4}N et 0,01 mm (MTS)) de la machine vient compresser la bille à une vitesse de 0,01mm/sec (cf. figure 52).

Figure 51 : De gauche à droite: Machine MTS Synergie 400 et Machine BOSE Electroforce 3230

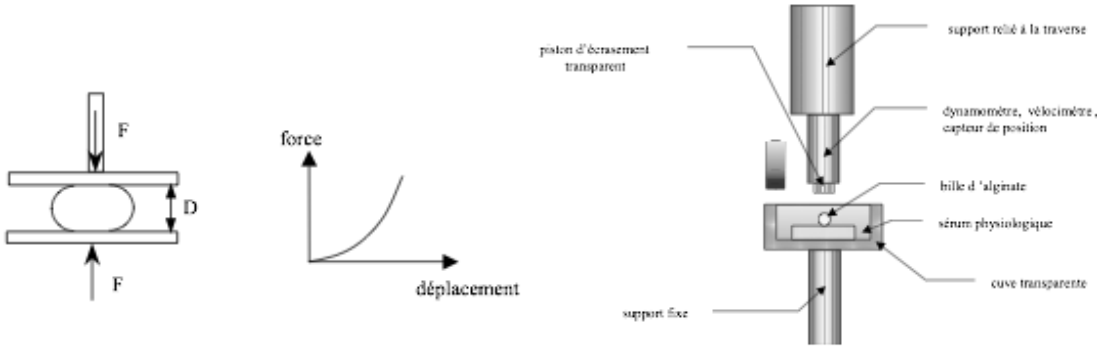


Figure 52: Schémas de la méthode utilisée.

Pour le traitement des résultats de compression, les calculs sont basés sur la théorie de Hertz. La théorie de Hertz établit la relation entre la force de compression F et la déformation d'une bille sphérique. Les hypothèses sur lesquelles se base cette loi sont les suivantes :

- La charge imposée sur la bille est supposée de direction normale à sa surface.
- Le matériau composant la bille est élastique.
- Le matériau composant la bille obéit à la loi de Hooke : s = E.e, E étant le module d'élasticité ou module de Young, e correspond à la déformation du matériau et s la contrainte.

Les expériences se font dans un cadre où les déformations induites restent très faibles (déformations inférieures à 15%).

Ainsi, pour une sphère de rayon initial en contact avec deux plaques rigides, la force F s'exprime selon l'équation suivante : $$F = \frac{8\mu {r_0}^2 \delta^{1.5}}{3(1-\upsilon)}$$

Avec µ, le module de cisaillement, δ le déplacement, r_0 le rayon de la bille et υ, le coefficient de Poisson.

L'alginate est considéré comme un matériau incompressible, donc υ = 0.5 et l'équation devient alors : $$F = \frac{8\mu {r_0}^2 \delta^{1.5}}{1.5}$$

L'équation peut donc s'écrire sous la forme : $$\frac{(1.5)F}{8r_0^2} = \mu\delta^{1.5}$$

Le tracé d'une droite peut alors se faire en fonction de $\delta^{1.5}$ où la pente sera le module de cisaillement µ. Ce module nous informe sur la résistance mécanique de la bille.

II.1.4.2 Visualisation de la perméabilité des billes par microscopie confocale

Les billes peuvent être mises en contact avec un composé fluorescent (conjugué avec un fluorochrome FITC) pour visualiser par microscopie confocale une perméabilité de la bille vis-à-vis du composé en question. Les protocoles ont été réalisés à partir des travaux de Wang et al.[90].

De l'albumine fluorescente (Sigma Aldrich) à 100 µg /ml dans du Milieu William E est mise en contact pendant 15-20h sans agitation avec des billes d'alginate ne contenant pas de cellules. L'observation est faite grâce à un microscope confocal. Un rinçage au William E est ensuite réalisé et une observation faite après 1h de relargage. L'albumine a un poids moléculaire de 65kDa.

De même, des billes ont été mises en contact avec des immunoglobulines G fluorescente à 100 µg /ml dans du milieu William E ou du SVF pendant 15-20h sans agitation. Les immunoglobulines G ont un poids moléculaires d'environ 150kDa et sont les principales immunoglobulines du sérum.

Enfin, pour visualiser la perméabilité aux gaz des billes d'alginate, du ruthénium a été utilisé. La fluorescence de cet élément augmente en absence d'oxygène. L'incubation a été faite à une concentration de 1mg /ml dans du William E pendant 30 minutes sans agitation. Selon les conditions testées, ensuite un bullage de CO_2 ou d'O_2 de quelques minutes est réalisé et l'observation se fait 10 minutes plus tard au microscope confocal. Les paramètres utilisés ont été définis suite à une étude bibliographique [91] [92].

II.2 LA FLUIDISATION HOMOGENE

La fluidisation est un procédé permettant de maintenir en suspension des particules solides dans un fluide et dans un volume donné. Dans le milieu industriel, lors de réactions catalytiques par exemple, des lits fluidisés sont utilisés pour assurer un bon échange de masse ou de chaleur entre un fluide en écoulement et un solide sous forme de petites particules. Le “lit” de particules solides est placé dans un courant ascendant de fluide. Les particules étant plus denses que le fluide, elles ont tendance à sédimenter au fond du réacteur et à former un empilement compact. La traînée exercée par le fluide qui s’écoule tend au contraire à soulever les particules. Lorsque la traînée est supérieure au poids apparent des particules, les particules sont soulevées du fond et le sédiment devient moins compact. Il y a alors fluidisation du lit de particules. La fluidisation peut apparaitre sous différents régimes parmi lesquels se trouve la fluidisation dite homogène.

II.2.1 Les différents régimes de fluidisation

Le repérage des régimes dans un réacteur peut se faire de multiples manières. L'une des plus simples consiste à repérer la succession des régimes par l'amplitude des fluctuations temporelles d'une différence de pression pariétale locale, placée par exemple en partie médiane du réacteur. Lors de la fluidisation homogène la vitesse superficielle de perfusion est inférieure à $u_{mb,}$ le lit de particules est contenu dans un volume constant et la perte de charge est stable. Les particules emportées par le flux ascendant s’élèvent dans le réacteur jusqu’à une hauteur définie par la vitesse terminale de chute. Les particules se comportent globalement comme un fluide. Des fluctuations sont observées à partir du régime de bullage, tout d'abord, les amplitudes des fluctuations augmentent en regard de la taille croissante des bulles et des perturbations de pression qu'elles induisent dans le réacteur. Puis, un maximum est atteint lorsque la vitesse superficielle de perfusion atteint la limite u_{mb} (vitesse minimale de bullage). L'amplitude diminue car les bulles sont déchirées par le passage de plus en plus rapide du gaz en leur sein. Cette diminution a lieu jusqu'à la vitesse u_{tu}. Certains auteurs distinguent alors un régime dit turbulent entre les deux vitesses limites u_{tu} et u_t. Ce régime a tout de même une existence assez discutée pour certaines catégories de solides. Au-delà d’u_t, le régime de fluidisation rapide est celui régnant notamment dans les réacteurs dits à lit circulant (cf. figure 53). Les caractéristiques de ces régimes sont les suivantes :

- Tant que $u < u_{mb}$: régimes de lit fluidisés captifs (homogène, bouillonnant, pistonnant), le lit peut être maintenu dans le réacteur sans dispositif de recirculation des particules qui s'envoleraient.

Trois vitesses peuvent être distinguées au-delà: u_{mb}, u_{tu}, et u_{tr}

- pour $u_{mb}<u<u_{tu}$: régime de transition vers le régime turbulent les bulles se déchirent, la surface du lit devient mal définie, beaucoup d'entraînement,
- pour $u_{tu}<u<u_t$: régime turbulent pas de bulles, pas de surface de lit, maintien du lit nécessite une recirculation,
- pour $u>u_t$: fluidisation rapide les solides s'agencent en amas, le profil de concentration en solides le long de l'axe vertical du réacteur est uniforme la concentration en solides dans le réacteur dépend du débit de recirculation [93].

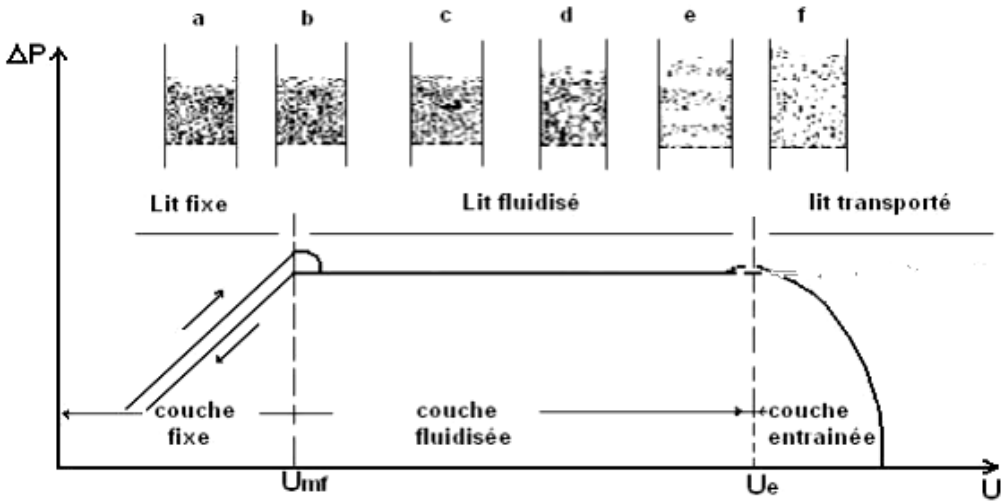


Figure 53: Différents régimes de fluidisation en fonction de la vitesse superficielle du fluide ou vitesse terminale de chute avec u_{mf}, vitesse minimale de fluidisation, et u_e ou u_t, vitesse de terminal de chute [94]

En fluidisation les différents régimes sont aussi différenciés par le nombre de Reynolds particulaire à la vitesse terminale de chute :

$$Re_t = \frac{\rho_f u_t d_p}{\mu_f} \qquad (1.1)$$

Où ρ_f est la masse volumique du fluide, u_t la vitesse terminale de chute, d_p le diamètre des particules et μ_f la viscosité du fluide. Trois régimes peuvent être distingués :

- le régime laminaire pour $Re_t < 0,2$,
- le régime intermédiaire pour $0,2 < Re_t < 500$ (cas du lit fluidisé homogène SUPPLIVER),
- et le régime turbulent pour $Re_t > 500$.

II.2.2 Modélisation de la fluidisation homogène

Les paramètres influant sur la fluidisation sont la vitesse du fluide u, la perte de charge ΔP et la porosité Ɛ. La porosité reflète l'expansion du lit fluidisé. La porosité expérimentale du lit des billes peut être calculée en faisant le rapport suivant :

$$\varepsilon = \frac{volume\ du\ lit - volume\ des\ billes}{volume\ du\ lit}$$

Le volume du lit peut être déduit à partir de la hauteur du lit (mesurée lors des expériences de fluidisation) et de la section du bioréacteur (calculée avec le diamètre du bioréacteur).

Des modèles calculant la porosité du lit fluidisé ont été utilisés à visée prédictive pour la planification des manipulations ou pour l'interprétation de données expérimentales. Une caractérisation du lit fluidisé est nécessaire avant l'utilisation de ces modèles.

II.2.2.1 Caractérisation du lit fluidisé homogène

Tout d'abord, certaines valeurs, telles que le nombre d'Archimède (Ar), le nombre de Reynolds particulaire à la vitesse terminale de chute (Re_t), la vitesse terminale de chute (u_t) et la vitesse minimale de fluidisation (u_{mf}) sont nécessaires pour utiliser ces modèles.

II.2.2.1.1 Calcul du nombre d'Archimède (Ar)

Le nombre d'Archimède permet de caractériser le mouvement d'un corps dans un fluide, dû à leur différence de densité. Il s'agit du rapport entre les forces gravitationnelles, les forces d'inertie et les forces visqueuses. Il est calculé grâce à la formule suivante :

$$\mathrm{Ar} = \frac{d_p^3 g \rho_f (\rho_s - \rho_f)}{\mu_f^2} \qquad (1.2)$$

(Avec d_p : diamètre des particules solides (m), g=9,81 (m/s^2) : accélération de la gravité, ρ_f : masse volumique du fluide (kg/m^3), ρ_s : masse volumique des particules solides (kg/m^3) et μ_f : viscosité du fluide (Pa.s)).

II.2.2.1.2 Calcul du nombre de Reynolds particulaire à la vitesse terminale de chute (Re_t)

Re_t peut être calculé à partir du nombre d'Archimède (1.2) pour billes totalement sphériques selon la formule suivante :

$$\log Re_t(Ar) = -1{,}27380 + 1.04185 \log Ar - 0{,}060409(\log Ar)^2 + 0{,}0020226(\log Ar^3) \qquad (1.3)$$

Cette corrélation, applicable à une large gamme d'écoulement 0,01> Re_t >16000, a été déterminée expérimentalement par Hartman et al. [95] avec un écart type moyen de 3,3%.

II.2.2.1.3 Calcul de la vitesse terminale de chute (u_t)

A partir du nombre de Reynolds particulaire (1.1 et 1.3), il est possible de déterminer la vitesse terminale de chute.

$$u_t = \frac{Re_t \mu_f}{\rho_f d_p} \qquad (1.4)$$

Les effets de bords sont négligés car le diamètre des particules est très inférieur au diamètre du bioréacteur ($d_p/D \approx 0$).

II.2.2.1.4 Calcul de la vitesse minimale de fluidisation (u_{mf})

La vitesse minimale de fluidisation est obtenue à partir de l'équation d'Ergun exprimée au minimum de fluidisation pour une particule totalement sphérique :

$$\frac{1{,}75}{\varepsilon_0{}^3} Re_{mf} + \frac{150(1-\varepsilon_0)}{\varepsilon_0{}^3} Re_{mf} = \frac{d_p^3 \rho_f (\rho_s - \rho_f) g}{\mu_f^2} \qquad (2.1)$$

(ε_0 étant la porosité au repos et $Re_{mf} = \frac{\rho_f d_p u_{mf}}{\mu_f}$).

Une résolution de l'équation du second degré permet d'obtenir Re_{mf} et donc u_{mf}.

II.2.2.2 Exemples de modèles de fluidisation homogène

Les modèles mathématiques utilisés à partir de ces données sont des modèles empiriques ou semi empiriques grâce auxquels il est possible de déterminer la porosité (Ɛ) à partir de la vitesse moyenne du fluide ($u = \frac{débit}{section}$).

II.2.2.2.1 Modèle de Richardson et Zaki

Le modèle de Richardson et Zaki utilise l'équation $\frac{u}{u_t} = \varepsilon^n$ pour déterminer la porosité du lit [96]. L'indice n dépend du régime de fluidisation et donc du nombre de Reynolds particulaire à la vitesse terminal de chute:

- $n = 4{,}65 + \frac{20 d_p}{D}$, pour $Re_t < 0{,}2$
- $n = (4{,}4 + \frac{18 d_p}{D}) Re_t^{-0{,}03}$, pour $0{,}2 < Re_t < 1$
- $n = (4{,}4 + \frac{18 d_p}{D}) Re_t^{-0{,}03}$, pour $1 < Re_t < 200$
- $n = 4{,}4 Re_t^{-0{,}1}$, pour $200 < Re_t < 500$

- $n = 2{,}4$, pour $Re_t > 500$

Dans le cas de nos expériences Re_t est inférieur à 200 et supérieur à 1. L'équation $n = (4{,}4 + \frac{18d_p}{D})Re_t^{-0{,}03}$ a donc été utilisée.

II.2.2.2.2 Modèle de Foscolo

En fonction du régime de fluidisation, différentes équations peuvent être appliquées dans le cadre du modèle de Foscolo [97] :

- En régime laminaire ($Re_t < 0{,}2$) : $\frac{u}{u_t} = \frac{\varepsilon^4}{3{,}33(1-\varepsilon)+\varepsilon^5}$
- En régime intermédiaire : $\frac{u}{u_t} = \frac{(0{,}0777Re_t(1+0{,}0194Re_t)\varepsilon^{4{,}8}+1)^{0{,}5}-1}{0{,}0388Re_t}$
- En régime turbulent ($Re_t > 500$) : $\frac{u}{u_t} = \left[\frac{\varepsilon^4}{3{,}33(1-\varepsilon)+\varepsilon^5}\right]^{0{,}5}$

En cas de fluidisation homogène le régime est intermédiaire. La formule $\frac{u}{u_t} = \frac{(0{,}0777Re_t(1+0{,}0194Re_t)\varepsilon^{4{,}8}+1)^{0{,}5}-1}{0{,}0388Re_t}$ est donc applicable.

II.2.2.2.3 Modèles de Ganguly

Le modèle de Ganguly [98] est valable lorsque le nombre de Reynolds satisfait $0{,}12 < Re < 43{,}66$ ce qui est notre cas. L'équation utilisée est la suivante :

$$h = \frac{1{,}27M_s}{\rho_s D^2(1 - 1{,}762U + 0{,}95U^2)}$$

(Où $U = \frac{u-u_{mf}}{u_t-u_{mf}}$ (2.1), D le diamètre du bioréacteur utilisé et M_s la masse du solide).

II.2.2.2.4 Modèle d'Hirata et Bulos

Le modèle Hirata et Bulos [99] est valable lorsque le nombre de Reynolds satisfait $0{,}7 < Re < 3200$. La formule suivante peut alors être appliquée :

$$\varepsilon = \varepsilon_0 + (1 - \varepsilon_0)\varepsilon_{RZ}^A \exp(B(1 - \varepsilon_{RZ})) \qquad (2.2)$$

(Où $A = 2{,}2n + \frac{8d_p}{D}$, $B = 2{,}1$, $\varepsilon_{RZ} = \frac{u^{\frac{1}{n}}}{u_t}$ et $n = \frac{2(2{,}35+0{,}175Re_t^{0{,}75})}{(1+0{,}175Re_t^{0{,}75})}$).

II.2.3 Caractérisation des phases et mesure de la porosité initiale

La modélisation du comportement du lit fluidisé ne peut être réalisée sans une caractérisation des phases liquide et solide.

Le nombre d'Archimède (1.2) se calcule en connaissant d_p (le diamètre des particules solides), ρ_f (la masse volumique du fluide), ρ_s (la masse volumique des particules solides) et μ_f (la viscosité du fluide). De plus, la porosité initiale doit aussi être mesurée pour le calcul de la vitesse minimale de fluidisation (2.1) ou pour le calcul de la porosité dans le modèle d'Hirata et Bulos (2.2). Les méthodes utilisées pour les mesures de masses volumiques et de porosités sont celles précédemment décrites dans la thèse d'E. Doré [56].

II.2.3.1 Caractérisation des phases

II.2.3.1.1 Mesure de la taille des particules solides

Le diamètre des billes d'alginate est mesuré grâce à une loupe binoculaire Leica muni d'une caméra et d'un logiciel de traitement d'image (cf. figure 54) ou au microscope à épifluorescence. Une vingtaine de billes de chaque lot de fabrication sont mesurées à chaque expérimentation. Les billes ont en moyenne une taille proche des 950 microns.

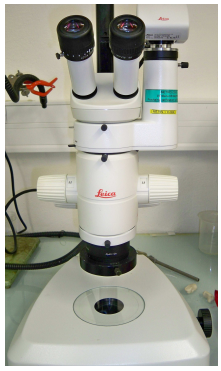


Figure 54: Loupe binoculaire Leica.

II.2.3.1.2 Calculs des masses volumiques

Les masses volumiques des phases liquide et solide sont mesurées grâce aux formules suivantes :

$$\rho_f = \frac{M_2 - M_1}{V} \quad \text{et} \quad \rho_s = \frac{M_3 - M_2}{M_3 - M_4} \times \frac{M_2 - M_1}{V}$$

Les masses M1, M2, M3 et M4 correspondent aux masses décrites par la figure 55.

Des fioles de 10ml sont utilisées avec environ 2ml de billes ajoutées. Cependant pour une mesure plus précise de la masse volumique du fluide un pycnomètre a aussi été utilisé. Cet instrument en verre, de volume connu et contrôlé, permet, par pesée, une meilleure précision qu'avec des fioles.

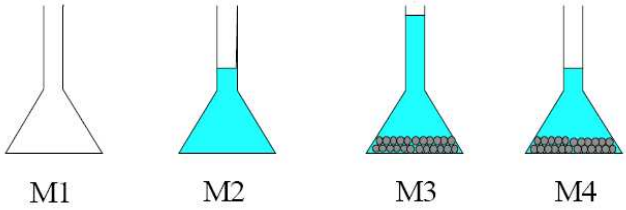


Figure 55: Masses mesurées pour les calculs de masses volumiques.

Les mesures des masses volumiques des différentes phases liquides sont présentées ci-dessous :

- Ringer à 22°C : 1001 kg/m^3
- Milieu de culture à 37°C : 1002 kg/m^3
- Plasma à 37°C : de 1005 à 1020 kg/m^3 en fonction du taux protéique
- SVF dilué de moitié dans du liquide physiologique à 37°C : 1002 kg/m^3
- SVF à 37°C : 1013 kg/m^3

La masse des billes d'alginate est difficile à déterminer à cause de l'imprécision de la méthode de mesure et du fait que la bille étant poreuse sa masse volumique dépend en partie du liquide dans lequel elle est immergée. Les mesures faites à 22°C dans du liquide physiologique suggèrent que la masse volumique des billes se situe entre 1020 et 1025 kg/m^3. Dans du plasma à 37°C, celle-ci serait plus aux alentours de 1010 à 1020 kg/m^3.

II.2.3.1.3 Mesure de la viscosité du fluide

Un viscosimètre d'Ubbelhode permet de mesurer la viscosité du fluide. Le temps que met le fluide pour s'écouler est mesuré entre deux graduations (M1 et M2 sur la figure 56) et un calcul donné par le fabricant permet de retrouver la viscosité cinématique du fluide.

Les mesures des masses volumiques des différentes phases liquides sont présentées ci-dessous :

- Ringer à 22°C : 1,00 Pa.s
- Milieu de culture à 37°C : 0,75 Pa.s

- Plasma à 37°C : de 0,80 à 1,50 Pa.s en fonction du taux protéique
- SVF dilué de moitié dans du liquide physiologique à 37°C : 0,75 Pa.s
- SVF à 37°C : 1,00 Pa.s

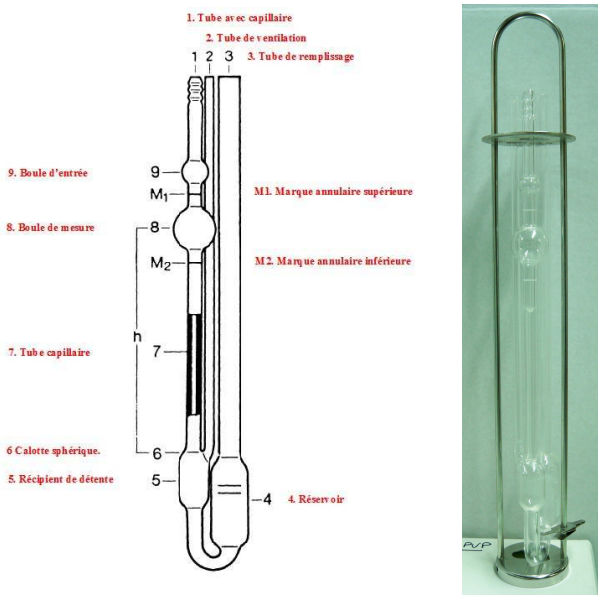


Figure 56: Viscosimètre d'Ubbelhode.

II.2.3.2 Mesure de la porosité initiale

Pour le calcul de la porosité initiale, la formule suivante est utilisée :

$$\varepsilon_0 = \frac{Vsérumphy}{Vsérumphy + Vbilles} \quad \text{soit,} \quad \varepsilon_0 = \frac{\rho_s(M2 - M3)}{\rho_s(M2 - M3) + \rho_f(M3 - M1)}$$

Les masses M1, M2 et M3 correspondent aux masses décrites par la figure 57. Le volume de billes utilisé est de l'ordre de 10 ml. Lorsque les billes flottent, la hauteur du lit flottant est mesurée et comparée à celle d'un lit tassé contenant un volume identique de billes et dont la porosité a été calculée. Quelque soient les conditions, la porosité initiale est toujours très proche de 0,3.

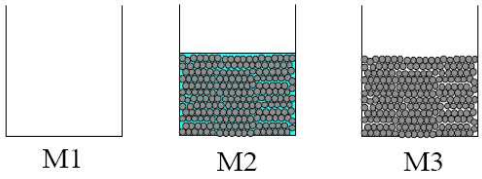


Figure 57: Masses mesurées pour le calcul de la porosité initiale.

II.3 CULTURE DE CELLULES HEPATIQUES C3A

La lignée HepG2 est la lignée cellulaire d'hépatocytes humains la mieux caractérisée et la plus utilisée en laboratoire. La lignée HepG2-C3A est utilisée depuis de nombreuses années à l'Université de Technologie de Compiègne comme modèle pour des études sur le métabolisme hépatique et pour des essais de toxicité prédictive. Elle a été utilisée au cours de ce doctorat pour permettre une mise au point des étapes de culture cellulaire avant l'utilisation de cellules primaires humaines lors de futurs essais.

II.3.1 La lignée cellulaire HepG2-C3A

Les cellules HepG2 proviennent d'un carcinome hépatocellulaire bien différencié de tissu hépatique humain mais elles ne sont pas tumorigènes. Elles sont adhérentes et prolifèrent en couche cellulaire ou en petits agrégats. Il a été démontré qu'elles avaient de nombreuses caractéristiques génotypique et phénotypique de cellules de foie normal et une large variété de réponses métaboliques à différentes sortes de médicaments [100]. La lignée C3A (ATCC-référence 10-741) est un sous-clone de HepG2 qui a été sélectionnée pour une forte inhibition de contact de la croissance, une haute production d'albumine, une forte production d'alphafœtoprotéine (AFP) et la capacité de se développer dans un milieu déficient du glucose. A confluence, la production d'albumine est accrue.

II.3.2 Conditions de culture des cellules hépatiques C3A

II.3.2.1 Culture en 2 dimensions des cellules hépatique C3A

Les cellules sont classiquement entretenues et prolifèrent en 2 dimensions dans des flasques traitées avec un revêtement pour cellules adhérentes et munie d'un bouchon perméable au gaz. Les cellules sont cultivées dans du Milieu Earle Minimum (MEM supplémenté avec 1 % de L- glutamine (200 mM) , 0,5% de pénicilline - streptomycine (10 000 unités / ml et 10 000 mg / mL respectivement), 1 % d'acides aminés non essentiels (10 mM) , une solution tampon HEPES à 1% (1 M) , du pyruvate de sodium à 1% (100 mM) et 10 % de sérum de veau fœtal) à 37°C et 5 % de CO2 dans une atmosphère humidifiée pendant environ une semaine. Le milieu est renouvelé tous les deux à trois jours. Une fois la confluence voulue atteinte (80%), un repiquage par trypsination est effectué (Trypsine avec 0,25% d'EDTA). Les cellules sont alors ensemencées à nouveau dans des flasques pour une nouvelle prolifération, encapsulées ou mise en culture dynamique pour une formation d'agrégats.

II.3.2.2 Culture en 3 dimensions des cellules hépatiques C3A

Dans le but d'améliorer les performances métaboliques des cellules hépatiques, une technique de formation de sphéroïdes sur support anti-adhérent a été mise en place par U. Pereira au cours du projet SUPPLIVER.

Pour permettre l'agrégation des cellules, il faut placer ces dernières (50 à100 millions de cellules) dans une boite de Petri de verre borosilicaté de 15cm de diamètre (Duran), dont le fond a été préalablement recouvert d'un revêtement antiadhésif, (Sigmacoate de Sigma Aldrich) avec 50ml de milieu de culture MEM. Des ergots en PDMS sont disposés sur le couvercle de la boite de Petri pour faciliter les échanges gazeux. Cette boite de Petri est placée durant deux à trois jours sur un agitateur orbital à 45 rpm (cf. figure 58), dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO2, et avec une atmosphère humidifiée.

Figure 58: De gauche à droite : Disposition d'une boite de Petri sur l'agitateur orbital Edmond Bhuler et Sphéroïdes de cellules C3A après deux jours d'agitation (observation par microscopie confocale)

II.3.2.3 Culture des cellules hépatiques C3A encapsulées

Une fois les billes produites les cellules encapsulées sont maintenue une nuit en statique dans une flasque avec du milieu de culture MEM.

Selon les expériences, la culture dynamique qui suit peut être réalisée dans du MEM ou dans du SVF dilué de moitié dans du liquide physiologique (condition pouvant être considérer comme se rapprochant d'une culture dans du plasma pathologique). Pour simuler des conditions pathologiques, un ajout d'ammoniac à 1mM dans le milieu a aussi été testé.

La culture dynamique peut se faire ensuite selon trois méthodes (cf. figure 59). :

- Une culture en fluidisation dans des bioréacteurs dont le design a été créé à l'UTC et qui ont été fabriqués par Medicolab. Leur volume est de 8ml. La culture a été faite durant 6 à 8h ou sur plusieurs jours avec des changements de milieu. La porosité du lit est mesurée grâce à la hauteur du lit fluidisé et contrôlée pour chaque condition par le débit appliqué.

- Une culture dans des boites de Petri en verre de 6cm de diamètre sigmacotées (Duran) pendant plusieurs jours en agitation orbitale à 40rpm comme pour la formation des sphéroïdes.
- Une culture en Spinner de 50ml (Wheaton) avec agitation magnétique à 100rpm.

Figure 59: De gauche à droite: Bioréacteur de taille réduite (Medicolab), Boite de Petri en verre de 6cm de diamètre (Duran) et Spinner de 50ml (Wheaton)

La congélation des cellules encapsulées ont été réalisée en immergeant les billes dans du SVF additionné de DMSO (10%) dans des cryotubes conservés dans une CryoBox à -80°C. La décongélation est faite dans un bain marie à 37°C suivit d'un rinçage au milieu de culture.

Lors de certaines conditions expérimentales de l'oxygène a été apporté aux cellules par l'intermédiaire d'un concentrateur d'oxygène (Compact525 de la société DeVilbiss Healthcare) (cf. figure 60). Ce concentrateur peut délivrer jusqu'à 5 litres d'oxygène à 93% ±3% par minute. Il comprend un panneau de commande simple à partir duquel le débit d'oxygène peut être réglé. Une sonde (0rion Star A123 de chez Thermo Scientific) a été utilisée pour contrôler le taux d'oxygène dissous. La mesure est affichée en mg/L et l'appareil ne peut mesurer des concentrations supérieures à 20mg/ml. L'oxymètre indique aussi la température de la solution dans laquelle il est immergé.

Figure 60: De gauche à droite: Concentrateur d'oxygène Compact525 et oxymètre Orion Star A123

II.3.3 Evaluation de la viabilité et de la densité cellulaire

II.3.3.1 Marquage au Hoeschst et à l'Iodure de propidium *in situ* dans les billes

La solution Mère de Hoeschst (10 mg/mL) est à diluer au 1/10 000ème. La solution Mère d'iodure de propidium (1mg/mL) est à diluer au 1/100ème. Les billes sont rincées au milieu Williams' E sans rouge phénol de chez Gibco (WE). Des cellules mortes sont obtenues comme témoin négatif en immergeant les billes dans de l'éthanol à 70% pendant 10 minutes. Un volume de 1ml de milieu marquage est utilisé pour marquer 0,5ml de billes. Les échantillons sont incubés 30 à 45 minutes à 37°C. Le milieu de marquage est éliminé par trois rinçages au WE. La viabilité / mortalité est constatée sous un microscope à épifluorescence Leica avec les filtres Texas RD pour la mortalité et DAPI pour la viabilité. Les cellules vivantes seront les cellules dont le noyau sera uniquement bleu par opposition aux cellules mortes qui auront un noyau bleu et rouge ou uniquement rouge.

II.3.3.2 Comptage de cellules C3A issues de sphéroïdes après dégélification des billes d'alginate

Après un rinçage des billes (0,1ml en lit tassé) avec du liquide physiologique, la dégélification est obtenue avec de l'alginate lyase (200µL à 0,1mg/ml) pendant 10 minutes à 37°C. La solution est ensuite pipetée énergiquement pour assurer une dégélification complète. Du liquide physiologique est ajouté (500µL) puis une centrifugation est effectuée à 1000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est jeté pour se débarrasser de l'alginate dégélifié.

Pour le comptage, une trypsination est tout d'abord réalisée pour séparer les cellules en sphéroïdes. Un volume de 200µL de trypsine agit pendant 5 à 10 minutes à 37°C. Du milieu MEM (600 microlitres) est ajouté en agitant la suspension pour séparer les cellules. La solution est pipetée pour mesurer le volume de manière précise (prélèvement de 1ml puis diminution manuelle du volume de la pipette jusqu'à chasser tout l'air résiduel). Le comptage des cellules se fait ensuite après une dilution de moitié au bleu Trypan pour marquer les cellules mortes. La densité est proche de celle d'une flasque de culture (1M/ml). Pour de faibles densités cellulaires dans les billes, une centrifugation peut être effectuée avant comptage (1000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante). Après centrifugation, le surnageant est jeté et le culot est repris dans les quelques 200µL de milieu restant. Le comptage se fait après une dilution de moitié au bleu Trypan.

II.3.4 Dosages biologiques des activités cellulaires

II.3.4.1 Dosage de l'albumine humaine

Le dosage de l'albumine humaine se fait par un test ELISA de type sandwich (Human albumin ELISA Quantitation Set, Cat. N°E80-129, Bethyl Laboratories). Des plaques à 96 puits sont utilisées. Des rinçages sont effectués entre chaque étape pour évier des réactions non spécifiques. Au fond des puits, des anticorps anti-albumine humaine sont déposés et adhèrent au fond des puits. Les échantillons sont ensuite ajoutés dans les puits. L'albumine va alors se fixer aux anticorps déjà présents (qui sont eux, en excès par rapport à l'albumine). Un anticorps anti-albumine humaine conjugué à une enzyme est mis dans les puits. Finalement un substrat est additionné. Ce substrat est transformé par l'enzyme du conjugué et va changer de couleur. On pourra alors lire l'absorbance et déterminer la concentration en albumine via une gamme étalon réalisée au sein des plaques. Le schéma général des réactions est donné sur la figure 61.

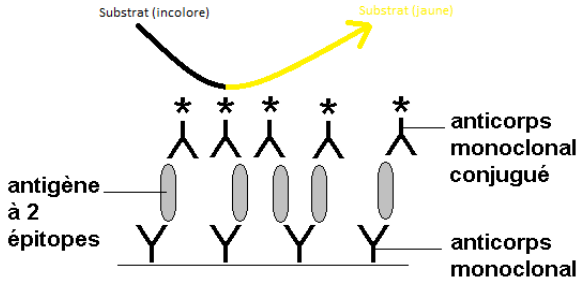


Figure 61 : Schéma général des réactions du test ELISA

Le protocole établi par A. Gautier est résumé dans la figure 62. La gamme étalon du tableau 4 a été utilisée avec des dilutions faites au milieu WE. Les échantillons sont utilisés purs ou dilués jusqu'à 1/1280 selon les échantillons testés.

Tableau 4 : Gamme étalon utilisée pour le dosage de l'albumine humaine avec le test ELISA

Puits	Concentration (ng/ml)
0	800
1	400
2	200
3	100
4	50
5	25
6	12.5
7	6.25

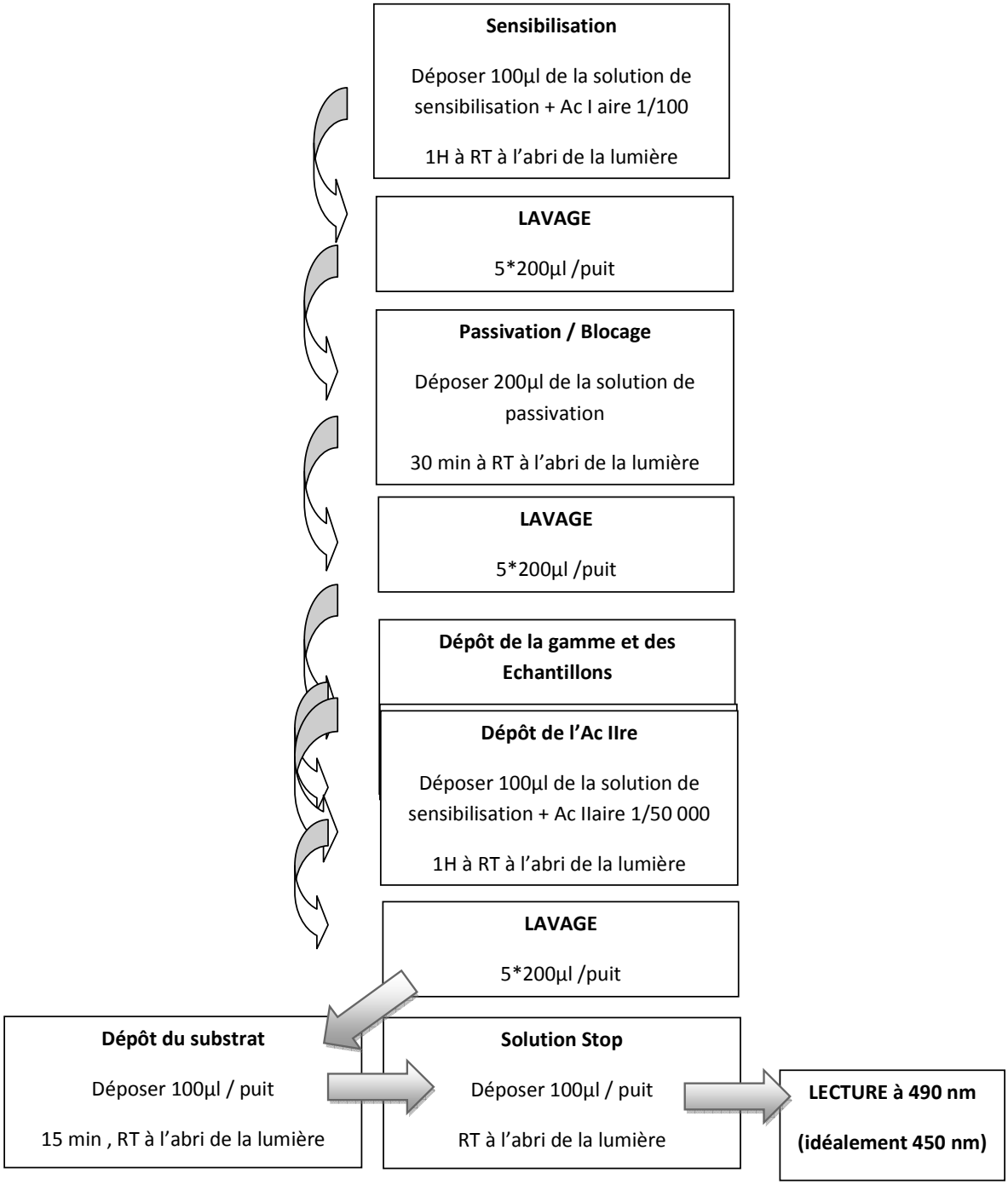


Figure 62:Protocole du test ELISA pour le dosage du glucose

II.3.4.2 Dosage de l'urée

Un kit de dosage de l'urée (QuantiChrom de BioAssay Systems), conçu pour mesurer directement l'urée dans des échantillons biologiques sans aucun prétraitement, a été utilisé. Le procédé utilise un réactif de Jung chromogène qui forme un complexe coloré spécifiquement avec l'urée. L'intensité de la couleur mesurée à 520 nm, est directement proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon. La formulation optimisée réduit considérablement les interférences par des substances dans les échantillons bruts. Cette méthode a notamment été choisie car les résultats ne sont pas influencer par la présence d'ammoniac dans le milieu [101].

II.3.4.3 Dosage de l'ammoniac

Le kit dosage de l'ammoniac utilisé a été conçu pour mesurer directement NH3 et NH4+ (EnzyChrom de BioAssay Systems). Dans cet essai, le NADH est converti en NAD + en présence de NH3, cétoglutarate et de l'enzyme glutamate déshydrogénase. La diminution de la densité optique à 340 nm est directement proportionnelle à la concentration de NH3 dans l'échantillon.

II.3.4.4 Dosage du glucose

Pour le dosage du glucose, l'automate Kone Specific de chez Kone Instrument S.A. a été (cf. figure 63).

Figure 63 : Automate Kone Specific (Kone Instrument S.A.)

Le glucose est mesuré par une méthode enzymatique. En présence de glucose oxydase (GOD), le glucose en solution aqueuse est oxydé par l'enzyme glucose oxydase en acide gluconique avec formation de peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène réagit ensuite avec un chromogène que l'on dose finalement par spectrophotométrie à 510 nm (cf. figure 64).

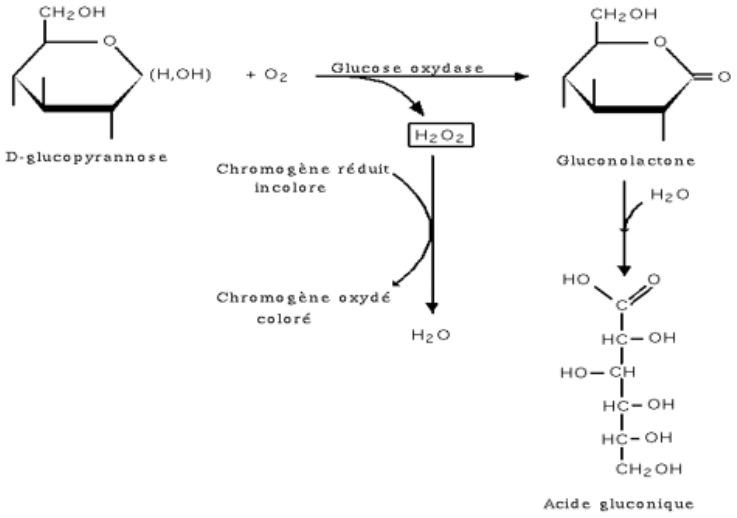


Figure 64 : Equations de réaction pour le dosage du glucose

Lors de l'interprétation de cette mesure il faut bien penser qu'il peut y avoir trois origines à la présence de glucose dans le milieu:

- Celui présent initialement dans le milieu de culture
- Celui présent initialement dans le cytoplasme des cellules sous forme de glycogène et qui a été excrété
- Celui produit par la cellule via la néoglucogenèse

II.4 LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE

Le développement de la circulation extracorporelle SUPPLIVER a été réalisé à partir des outils et connaissances disponibles chez Gambro. Les machines et composants du circuit sont tous commercialisés ou ont passés les étapes des essais cliniques. La circulation se compose d'éléments physiques (machines et composants) et d'un logiciel de pilotage. Le circuit créé ainsi que la thérapie associée ont pu être testés lors d'essais précliniques chez le mouton.

II.4.1 Les composants de la circulation extracorporelle

II.4.1.1 Les machines

La machine Prismaflex a été choisie pour le développement du circuit SUPPLIVER. Cette machine évolutive est utilisée en soins intensifs pour de nombreuses thérapies. La Prismaflex compte une pompe, dite pompe sang, qui peut atteindre des débits de 450 ml/min, 4 pompes, dites pompes fluides, qui peuvent atteindre 200ml/min et deux vannes à trois voies et un clamp automatique. Des capteurs sont présents sur la machine (un détecteur d'air dans le sang, un détecteur de fuite sang et cinq capteurs de pression). Un pousse seringue intégré est aussi disponible pour l'anticoagulation ou l'infusion de calcium (il n'a pas pu être utilisé car ne pouvant pas être géré par le logiciel de pilotage). Le circuit SUPPLIVER étant un circuit assez complexe, par rapport au circuit actuellement commercialisés, un dispositif additionnel (nommé Add-On) a dû être utilisé pour augmenter le nombre de vannes à trois voies et de capteurs de pression disponibles. L'Add-On possède deux capteurs de pressions, trois vannes à trois voies et une pompe fluide (non utilisée pour la thérapie SUPPLIVER). Cet Add-On a été à l'origine conçu pour une étude clinique. Un élément en plastique appelé cassette permet de positionner tous les composants, dispositifs et tubulures pour les fluides sur un même support. Cette cassette va ensuite pouvoir être placée sur la face avant de l'Add-On et du moniteur (cf. figure 65).

Figure 65: De gauche à droite : Machine Prismaflex et sa cassette et machine Add-On et sa cassette

II.4.1.2 Les petits composants du circuit extracorporel

Au niveau des lignes, permettant l'écoulement du sang ou du plasma, des petits composants sont présents pour le bon déroulement de la thérapie (cf. tableau 5).

Parmi eux des capteurs qui vont permettre d'assurer la sécurité du patient au cours du traitement. Chaque composant ou dispositif est associé à un symbole permettant de le représenter dans des schémas de circuit extracorporel.

Tableau 5: Petits composants de la circulation extracorporelle SUPPLIVER

Pompe		
Vanne 3 voies		
Piège à bulles		
Détecteur de fuite sang (BLD (Blood Leak Detector))		
Capteur de pression (POD)		
Détecteur d'air à ultrasons (UABD (Ultrasound Air Blood Detector))		
Clamp du retour au patient		
Clamp manuel		
Site de prélèvement		
Valve anti retour		

Des mesures ont été faites avec le détecteur de fuite sang ou BLD (Blood Leak Detector). Le BLD a été utilisé pour essayer de détecter des billes ou fragments de billes d'alginate. C'est un détecteur optique (cf. figure 66). Pour repérer les fuites d'hématies, il détecte la diffraction à 880nm.

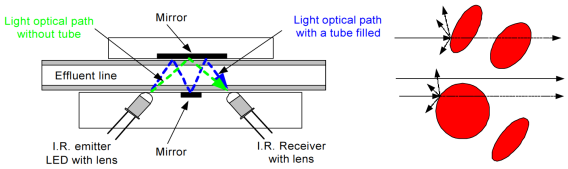
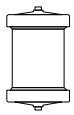
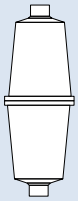
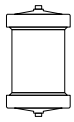
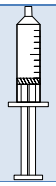
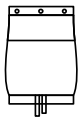


Figure 66: Principe de fonctionnement du détecteur de fuite sang

II.4.1.3 Les dispositifs du circuit extracorporel

Les dispositifs utilisés lors du développement du circuit sont répertoriés dans le tableau suivant (cf. tableau 6). Les lignes, connecteurs et certains dispositifs existent en deux catégories en fonction du poids du patient (par exemple l'Adsorba 150C s'utilise pour les poids de moins de 40kg sinon on utilisera l'Adsorba 300C.

Tableau 6: Dispositifs utilisés dans le circuit extracorporel SUPPLIVER

Bioréacteurs		
Plasmafiltres **TPE2000** **TPE6** **TPE2**		
Réchauffeur / oxygénateur : **Hilite 800/ Prismalung**		
Charbon actif: **Adsorba 150C / 300C**		
Cartouche échangeuse d'ions du système MARS : **IE250**		
Pousse seringue		
Poches de liquide		

II.4.1.3.1 Le Bioréacteur

Deux designs de bioréacteurs ont été testés : une cartouche identique à celles commercialisées dans le système MARS et un prototype de cartouche, appelé ENSO, originellement développé pour l'adsorption des endotoxines dans le choc septique. Ces deux dispositifs ont été équipés de répartiteurs pour casser le flux à l'entrée (cf. figure 67). La cartouche MARS à l'avantage d'être démontable (système vissé) avec des joints réutilisables. Pour la cartouche ENSO, en revanche, les différentes parties sont réunies en force ou par thermocollage (ce qui est irréversible). Les deux cartouches possèdent des tamis à leurs deux extrémités pour éviter les fuites de billes.

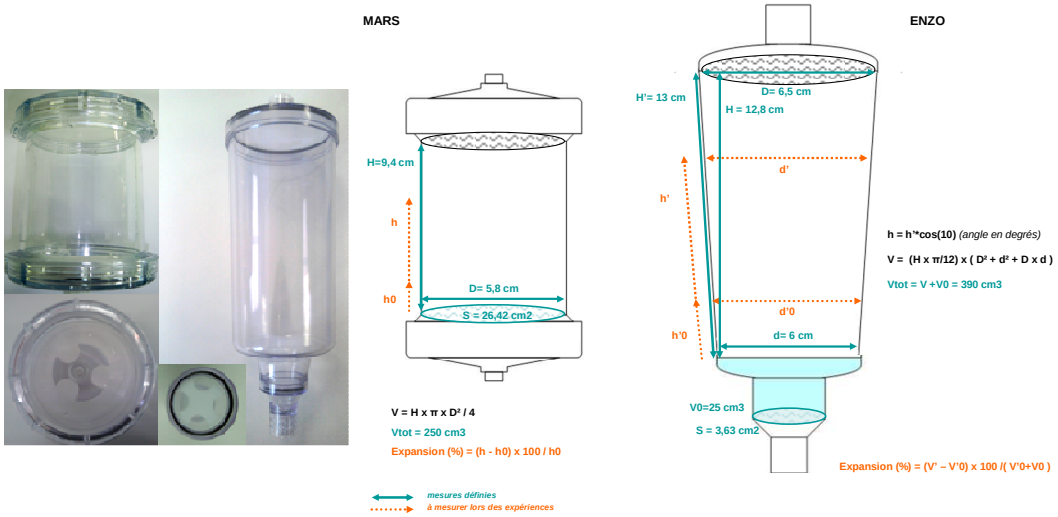


Figure 67: De gauche à droite: Cartouche MARS et son répartiteur, Cartouche ENSO et son répartiteur, et schémas et dimensions des deux bioréacteurs

II.4.1.3.2 Le plasmafiltre

Plusieurs plasmafiltres ont été utilisés au cours du développement de la circulation extracorporelle : le TPE2000, le TPE6 et le TPE2. Le TPE 2000 est un plasmafiltre commercialisé par Gambro pour des échanges plasmatiques thérapeutiques chez l'adulte (cf. figure 68). Il permet d'éliminer les molécules de haut poids moléculaire grâce à une membrane possédant un seuil de coupure d'environ 3000 kDa. Parmi les molécules pouvant passer cette membrane, ou trouve les complexes immuns, les anticorps, les toxines ou encore les médiateurs inflammatoires. Le TPE6 est une nouvelle version, pas encore commercialisée, du plasmafiltre TPE2000. Une diminution du temps de priming (remplissage et rinçage du dispositif avant son utilisation chez le patient) a pu être obtenue. Le TPE2 est l'équivalent du TPE6 mais utilisable sur des patients de faible poids. Il a été utilisé pour les premiers essais précliniques.

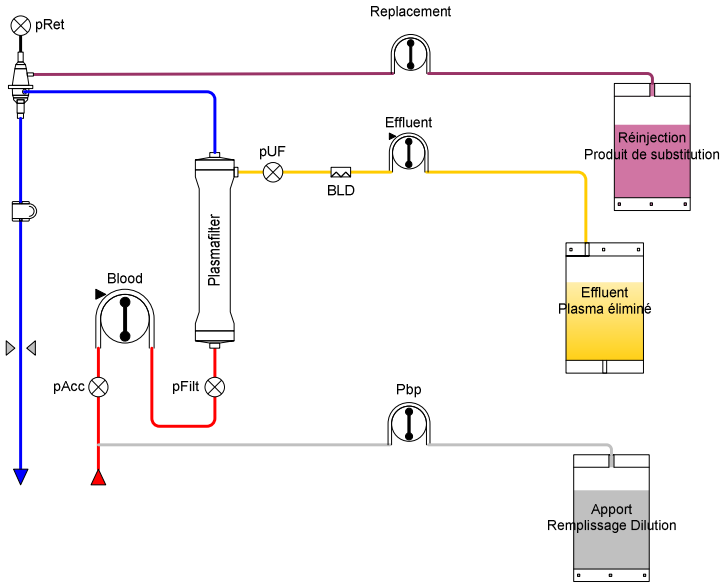
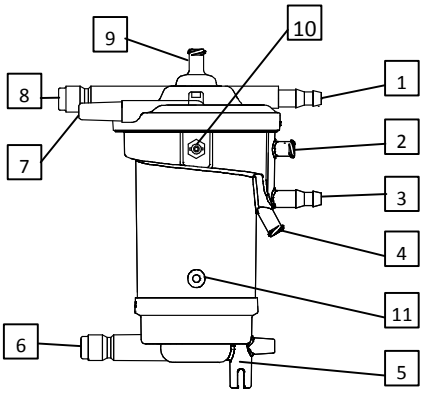


Figure 68: Schéma d'une thérapie d'échanges plasmatiques

II.4.1.3.3 L'oxygénateur/ réchauffeur

Le Hilite 800, fabriqué par la société Medos, vient d'être inclus à certains kits Prismaflex sous le nom de Prismalung. Cet oxygénateur est à l'origine utilisé chez les enfants où il est destiné à faciliter les échanges gazeux lors d'opérations à cœur ouvert. Il intègre un échangeur thermique. L'oxygénation et la décarboxylation du sang se fait par l'intermédiaire de fibres creuses poreuses. L'oxygène passe dans la lumière des fibres. L'échange thermique est effectué grâce à des fibres creuses non poreuses. De l'eau thermostatée circule à l'intérieur des fibres et le sang circule dans l'espace extracapillaire du dispositif (cf. figure 69).



1	Blood inlet	5	Gas outlet	9	Vent port, venous
2	Recirculation	6	Water inlet	10	Temperature, arterial
3	Blood outlet	7	Gas inlet	11	Rest bloodremovalport
4	Blood sample, arterial	8	Wateroutlet		

Figure 69: Schéma de l'Hilite 800

II.4.1.3.4 La cartouche de charbon actif

L'Adsorba est un dispositif commercialisé pour des traitements d'hémoperfusion dans le cas d'intoxications sévères. Le charbon actif se présente sous la forme de microgranules (pour maximiser la surface d'échange) pourvues d'un revêtement de cellulose pour garantir son hémocompatibilité.

II.4.1.3.5 La cartouche échangeuses d'ions

L'IE250 du système MARS est remplie d'une résine échangeuse d'ions. Cette cartouche contient des microbilles de cette résine.

II.4.1.3.6 Spécifications d'utilisation

Tous les dispositifs présentés ci-dessus s'utilisent selon des spécifications particulières au traitement pour lequel ils ont été développés. Pour réunir ces dispositifs dans un même circuit il a fallu se rapprocher au mieux de ces spécifications. Par exemple, les cartouches Adsorba et IE250 sont déjà remplies, de l'air ne doit pas circuler à l'intérieur de ces cartouches. Leur connexion doit donc se faire manuellement une fois le circuit rempli. Le tableau suivant (cf. tableau 7) regroupe les spécifications de chaque dispositif. Il a été fait à partir des instructions d'utilisation disponibles dans les brochures.

Tableau 7: Spécifications d'utilisation des différents dispositifs

	Adsorba	TPE2	Hilite 800	IE250 (MARS)
Priming	Connexion manuelle - Rinçage avec 500ml dextrose et 2000ml de liquide physiologique hépariné (2500IU/L) - Débit 100-150 mL/min	Rinçage avec 1000mL de liquide physiologique hépariné (5000IU/L) - Débits : Sang 65 ml/min (25s) 25ml/min (30s) 160ml/min (340 s) Effluent 145 ml/min (180s)	Remplissage du haut vers le bas - Rinçage avec 1000ml de liquide physiologique - Coating Rhéoparine (17UI) - Débit 300mL/min - Retournement pour dégazage	Connexion manuelle- Rinçage avec 1700ml de liquide physiologique non hépariné- Débit 150ml/min
Volume	140mL	40mL (17ml de sang)	55ml	100ml
Traitement	Utilisation sur du sang - Débit 50-150ml/min - 6h	Utilisation sur du sang - Débit 50-180ml/min (sang) 10-35ml/min (effluent) - 6h	Utilisation sur du sang - Débits: 450ml/min (sang) 1,2L/min (oxygène) - 24h	Utilisation sur un dialysat d'albumine - Débit 100-200ml/min - 24h
Restitution du sang	Retournement à la restitution 10-100ml/min	10-100ml/min	Pas de spécifications	Pas de restitution (dialysat d'albumine)

II.4.1.4 Les dispositifs externes de mesure

II.4.1.4.1 Capteurs de pressions

Pour mesurer des pertes de charge au sein des lignes, des mesures de pressions ont été faites avec une centrale d'acquisition de chez National Instruments. Les capteurs utilisés peuvent être connectés directement sur une ligne ou être placés sur une dérivation du flux (cf. figure 70).

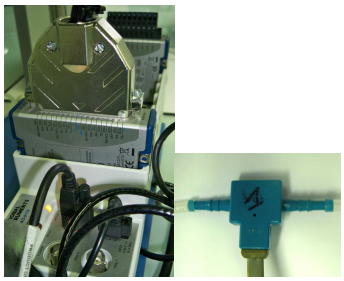


Figure 70: La centrale d'acquisition National Instruments et un capteur de pression

Pour calculer des pertes de charge dans une ligne la formule de Hagen Poiseuille a été utilisée.

$L = \Delta P \pi D^4 / 128 \mu Q$ avec L la longueur de la ligne (m), ΔP la perte de charge (Pa), D le diamètre (m), μ la viscosité de l'eau ($\mu = 1.10^{-3}$ Pa.s) et Q le débit (m^3/s)

II.4.1.4.2 Sondes de températures

Pour connaître les pertes thermiques au niveau de la circulation extracorporelle, la centrale d'acquisition National Instruments a été équipée de sondes thermocouples. Ces sondes ont pour défaut d'être invasives car elle s'insère à l'intérieur des lignes (cf. figure 71).

Figure 71: Sondes thermocouples

La puissance thermique est mesurée avec l'équation suivante.

$P = Q*C*\Delta T$ avec P la puissance thermique (W), Q le débit (ml/s), C la capacité calorifique de l'eau (4,186 J/ml. °C) et ΔT la différence de température (°C)

II.4.2 Le logiciel de pilotage de la circulation extracorporelle

L'outil utilisé pour le pilotage de la circulation extracorporel est le logiciel X-Lab. X-Lab est un outil de laboratoire créer pour la machine Prismaflex [102]. Ce logiciel s'exécute dans un environnement Microsoft Windows et permet le contrôle du fonctionnement d'un moniteur Prismaflex en utilisant un ordinateur externe. Les flux de données entre l'ordinateur et le moniteur sont réalisés au moyen d'un adaptateur Aardvark I2C / SPI qui relie le port USB de l'ordinateur au bus I2C interne du moniteur (figure 72).

Figure 72: Fonctionnement du système de pilotage

X-Lab est destiné à être un outil de laboratoire polyvalent qui, en plus de permettre d'avoir un contrôle complet de la machine Prismaflex, permet de mettre en place une interface utilisateur personnalisée, d'afficher automatiquement des graphiques des données recueillies, de faire fonctionner des séquences opérationnelles prédéfinies, d'exécuter des programmes, et de surveiller des conditions d'alarmes spécifiées et d'agir en conséquence.

L'idée d'un tel programme provient d'une vue conceptuel du moniteur Prismaflex comme un banc, autonome et multifonctions, de laboratoire. Le banc Prismaflex a l'avantage d'être constitué d'un support jetable facilement modifiable (cassette) et de pièces de rechange facilement disponibles (puisque produites pour être incluses dans des circuits commercialisés). Cela le rend idéal pour une utilisation pour des expérimentations de laboratoire impliquant des configurations de circuits sophistiqués qui nécessitent des conditions d'exploitation complexes comme c'est le cas pour le projet SUPPLIVER.

II.4.2.1 Exigences du système

Les éléments suivants sont nécessaires pour l'utilisation de X-Lab :

- Un moniteur Prismaflex (version 3.2 à 7.10),
- Un ordinateur portable,
- Un Aardvark I2C / SPI (de Total Phase Inc.) avec le firmware v3.5,
- Un port USB pour l'Aardvark (version 2.10),
- Un système d'exploitation Windows de Microsoft (version Windows 7 ou supérieure).

II.4.2.2 Présentation générale

La figure 7 représente la fenêtre principale du logiciel qui s'affiche une fois X -Lab exécuté. L'écran est composé de trois sections principales (entourées en rouge sur la figure 73) : (1) la barre de menu, (2) la barre d'outils et (3) les onglets.

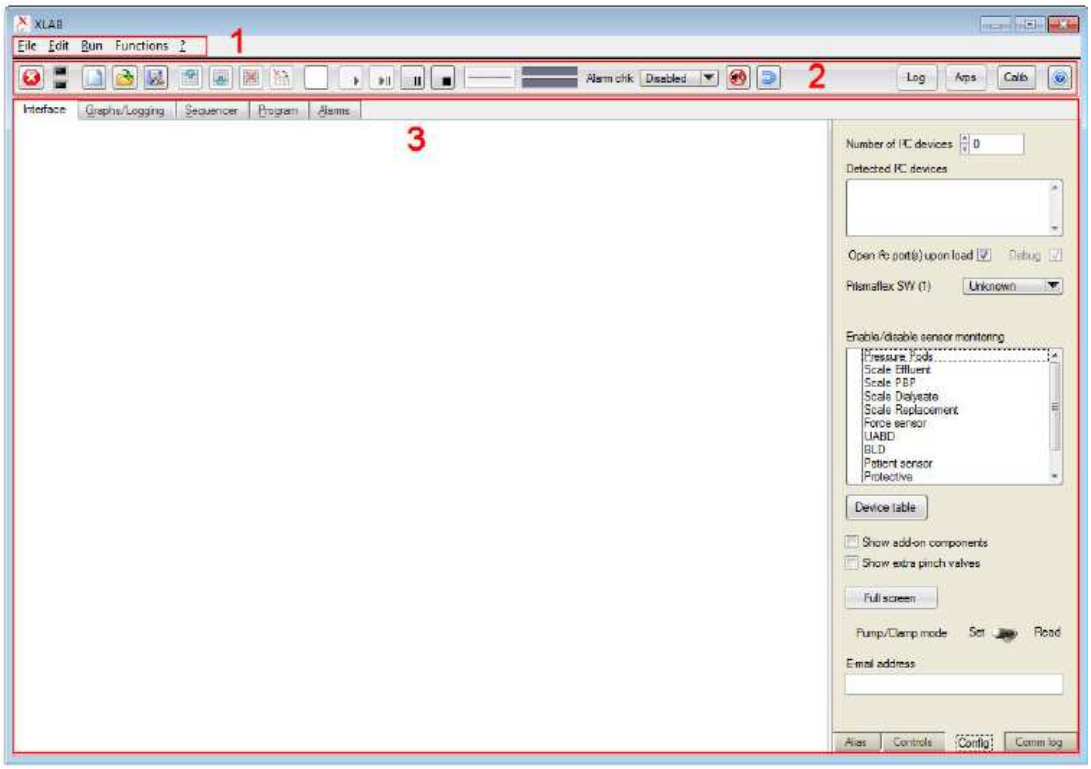


Figure 73: Capture d'écran montrant la fenêtre qui apparait lors de l'ouverture d'X –Lab avec (1) la barre de menu, (2) la barre d'outils et (3) les onglets

La barre de menu et la barre d'outils permettent à l'utilisateur d'agir sur les onglets. Ces deux outils ont approximativement les mêmes fonctions. Les onglets constituent les principaux domaines de travail.

Ils permettent d'accéder à cinq panneaux dont chacun a une fonction spécifique :

1. Le panneau Interface permet d'interagir avec le moniteur, ainsi qu'avec les autres panneaux.
2. Le panneau Enregistrement / Graphiques contient les graphiques des débits, des pressions, des poids et de paramètres personnalisés. Il contient également des outils liés à l'enregistrement des données.
3. Le panneau Sequencer permet d'entrer des instructions à la machine qui seront exécutées dans l'ordre dans lesquelles elles sont définies sur un lapse de temps spécifié.
4. Le panneau Programs est une fonctionnalité avancée d'X-Lab, qui permet l'édition et l'exécution de programmes (de type script).
5. Le panneau Alarms permet de gérer le système d'alarme du programme qui va, chaque fois qu'une condition d'alarme est remplie, exécuter des actions spécifiées par l'alarme déclenchée.

En plus des cinq panneaux à onglet, le programme comporte plusieurs sous-panneaux qui sont ancrés à l'intérieur des 5 panneaux. Plusieurs panneaux déroulants sont également disponibles pour effectuer diverses fonctions (Etalonnage, contrôle de la pompe ARPS pour le réglage du niveau du piège à bulles...).

II.4.2.2.1 Le panneau d'interfaces

Ce panneau est en un sens l'interface graphique du système et permet de contrôler de manière interactive la machine Prismaflex. Il est personnalisable dans une large mesure ce qui lui permet de représenter une vaste gamme d'interfaces que l'utilisateur peut adapter à ses besoins. La figure 74 montre un panneau d'interface qui comprend des commandes permettant de modifier le débit des pompes, l'affichage des valeurs de pression, le chargement de la cassette... Il contient également une image bitmap du moniteur Prismaflex et 2 boutons personnalisés (« Start » et « Stop ») dont chacun peut être relié à un script défini par l'utilisateur.

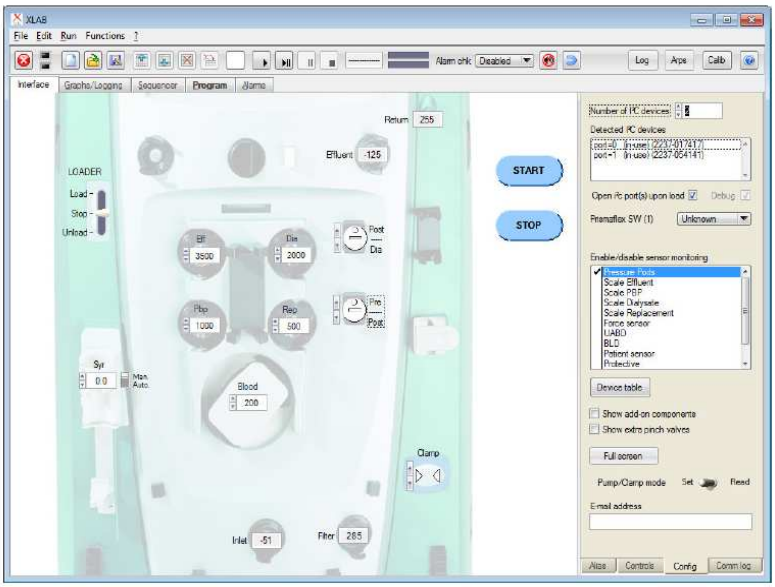


Figure 74: Capture d'écran du panneau d'interface

II.4.2.2.2 Le panneau des graphiques

Ce panneau affiche en permanence plusieurs données qui sont automatiquement recueillies. Il se compose de cinq sous-panneaux : (1) les débits des pompes, (2) les valeurs de pression, (3) les valeurs de poids, (4) les paramètres personnalisés, et (5) un graphique personnalisé. Une capture d'écran du panneau des graphiques est présentée à la figure 75. On peut voir le graphique des débits des pompes pendant une séquence d'amorçage (remplissage du circuit).

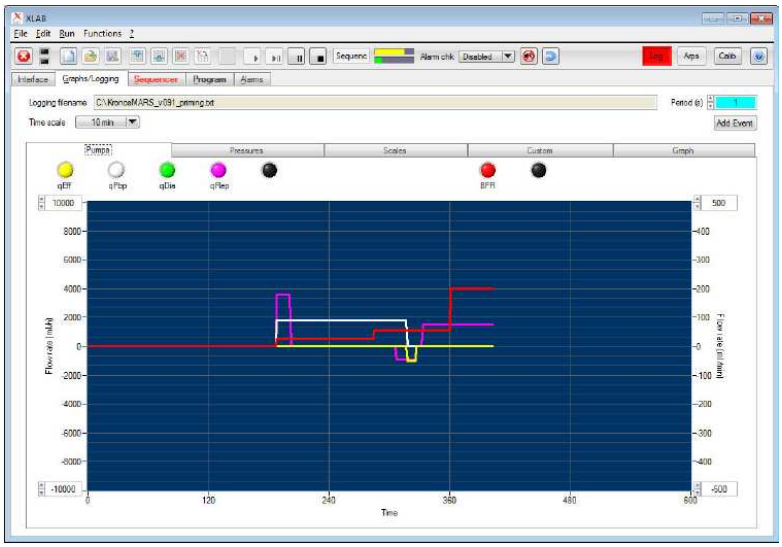


Figure 75: Capture d'écran du panneau de graphiques montrant le sous-panneau des débits des pompes

II.4.2.2.3 Le panneau des séquences

On utilise le panneau des séquences pour entrer des actions qui seront exécutées par la machine Prismaflex de manière automatisée. L'exécution se fait de manière séquentielle. La figure 76 montre une capture d'écran du panneau des séquences contenant les informations pour une séquence d'amorçage. Chaque ligne de la séquence contient la description, la valeur et la durée de l'action à mener. En fonctionnement, on peut suivre visuellement la progression du traitement de la séquence au moyen de deux barres de progression dans la barre d'outils.

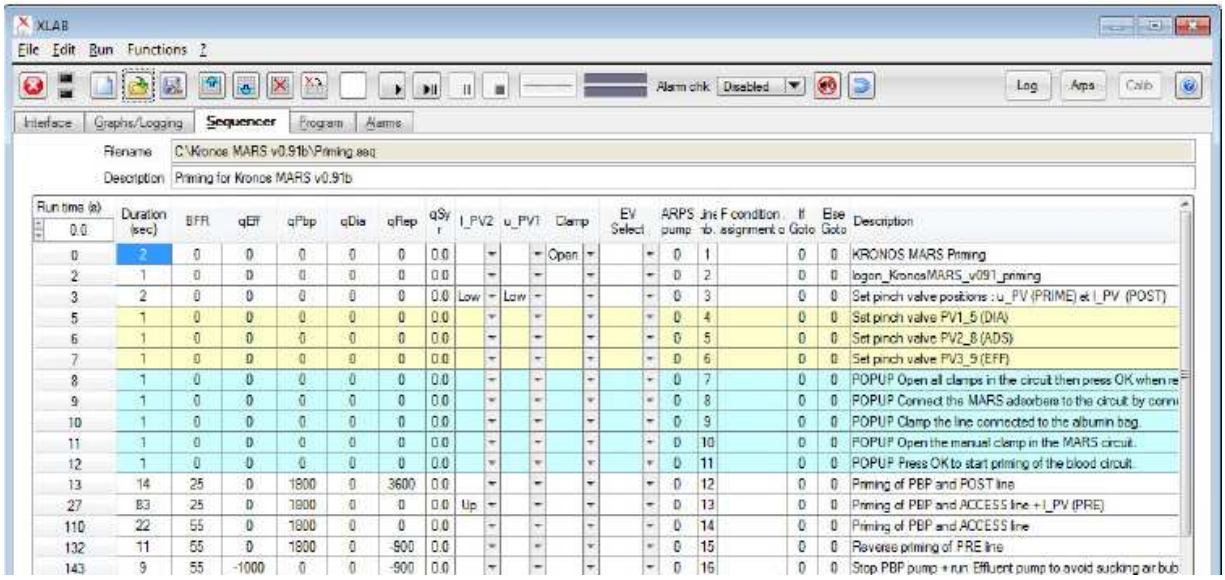


Figure 76: Capture d'écran d'une séquence d'un amorçage définie dans le panneau des séquences

II.4.2.2.4 Le panneau des programmes

Le panneau de programmes est une fonctionnalité avancée du logiciel X-Lab qui permet l'édition et exécution de scripts. Le langage des scripts utilisé est spécifique à X-Lab. En principe, chaque instruction peut être considérée comme une instruction conditionnelle (« If » ou « Else ») avec un « Go to » correspondant à un lien vers une ligne du programme (cf. figure 77). Le panneau des programmes offre une assez grande bibliothèque de fonctions. La bibliothèque de fonctions contient des fonctions destinées aux opérations mathématiques de base, à la manipulation des tableaux, à la manipulation de l'interface graphique, au filtrage des données, à la gestion des alarmes etc.

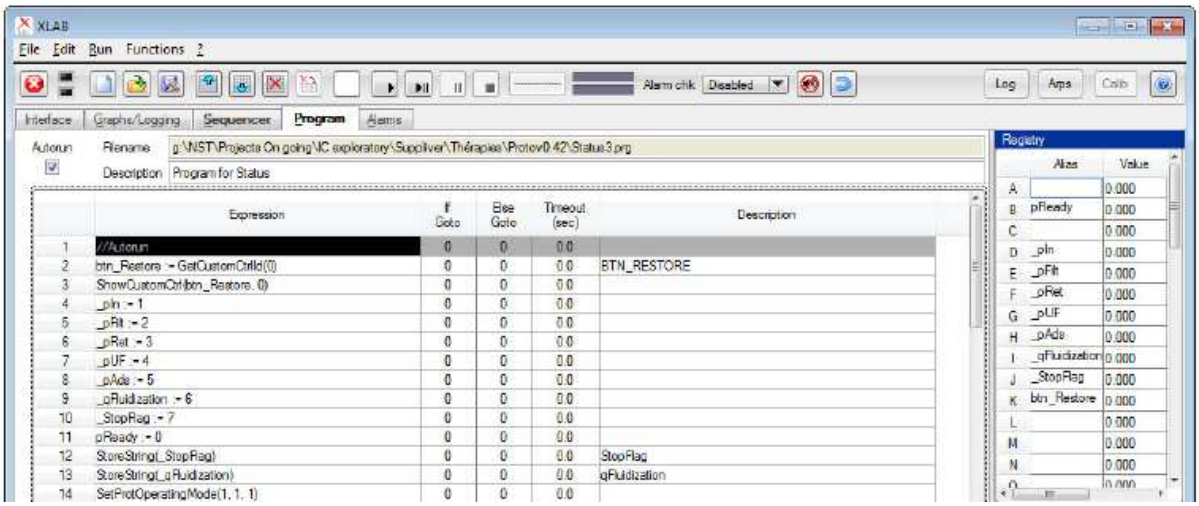


Figure 77: Capture d'écran du panneau des programmes dans lequel un exemple de script est chargé

II.4.2.2.5 Le panneau des alarmes

Le développement de la circulation extracorporelle SUPPLIVER a nécessité de complexifier le système de gestion des alarmes (notamment en y incluant une hiérarchisation complexe et des signaux sonores correspondant).

Le panneau des alarmes permet de définir des conditions à surveiller. Le système vérifie en continue les alarmes spécifiées par l'utilisateur, si une ou plusieurs conditions d'alarme sont remplies, il y a exécution d'une action connexe. Une bannière colorée, un signal sonore et un message indiquent qu'une alarme a été déclenchée (cf. figure 78).

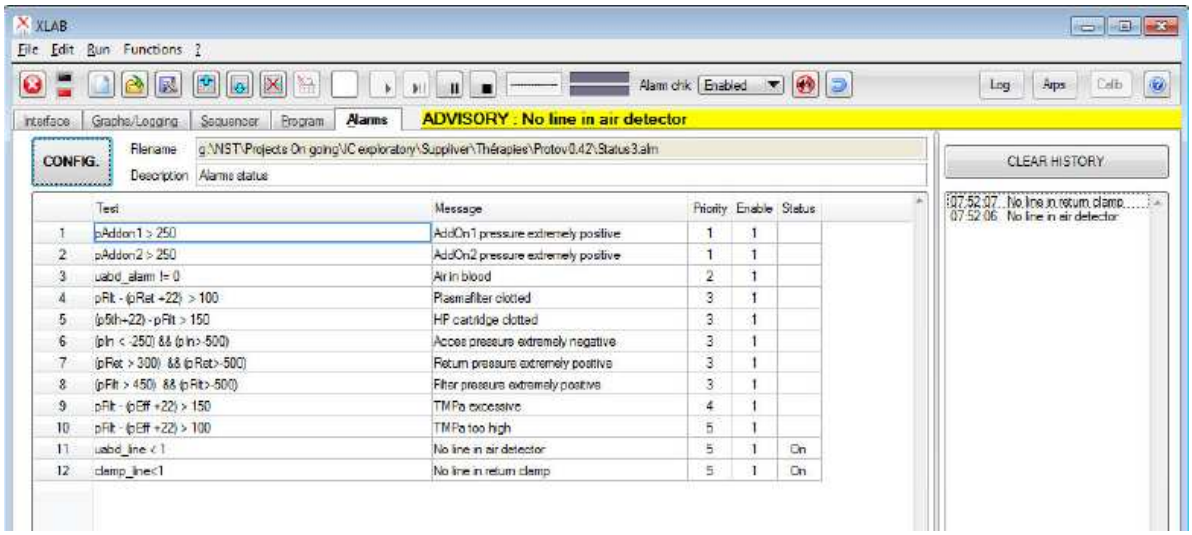


Figure 78: Capture d'écran du panneau des alarmes avec l'exemple d'une alarme enclenchée

Un panneau de configuration des alarmes permet de définir les informations sur les catégories d'alarmes et les actions correspondantes (cf. figure 79). Chaque alarme doit appartenir à une catégorie correspondant à son ordre de priorité.

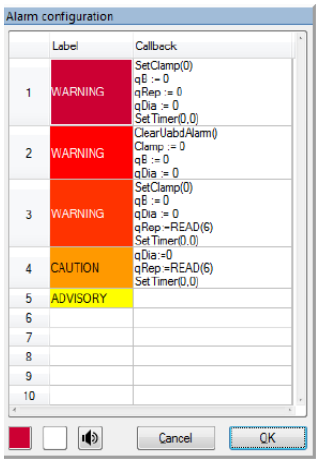


Figure 79: Capture d'écran d'un exemple de tableau de configuration des alarmes

Le système scanne toutes les alarmes définies dans le panneau des alarmes à une période de 100ms. Si une alarme est déclenchée, elle ne peut pas être remplacée par une autre alarme d'une catégorie ayant la même ou une priorité inférieure. Cependant, le déclenchement d'une alarme avec une priorité plus élevée prendra le relais sur une alarme existante de priorité inférieure. Une fois, une ou plusieurs alarmes déclenchées, elles ne vont pas disparaître de l'écran même si les conditions de leur existence ne sont plus remplies. C'est seulement en appuyant sur le bouton avec une flèche bleue sur la barre d'outils qu'il pourra y avoir une réinitialisation de toutes les alarmes.

II.4.3 Protocole des essais précliniques sur modèle ovin

II.4.3.1 Intérêt et objectifs des essais précliniques

Ces essais précliniques explorent le risque d'une forte hémodilution. En effet, la circulation extracorporelle SUPPLIVER a un volume d'environ 1,5 L (250 ml de sang ainsi que 1,25L de plasma). Deux type de priming ont été testés : un priming classique au sérum physiologique et un priming au plasma autologue (pour éviter tout type de rejet). Le principal objectif de cette étude a été de dénombrer la proportion d'animaux ayant survécu jusqu'à la fin du traitement. L'hémodynamique a été surveillée (pression artérielle moyenne) ainsi que l'hémodilution (niveaux d'hématocrite et de protéines totales).

II.4.3.2 Equipements

Cette section ne liste pas de tous les équipements standards nécessaires pour l'exécution et le suivi de traitements effectués sur les moutons mais toutes les pièces spécifiques à ce protocole particulier destiné aux essais SUPPLIVER.

- Une machine Prismaflex équipée d'un software modifié
- Une machine Add-On
- Deux Aardvarks (un pour la Prismaflex et un pour l'Add-On)
- Un ordinateur portable contenant le logiciel X-Lab et la thérapie version 0.43
- 4 circuits SUPPLIVER de version 0.4 sans cartouche IE250 ni filtre à particules
- Un bain thermostaté
- Une pompe pour le chauffage
- Un pousse-seringue
- Deux réchauffeurs de poches de liquide
- 8 x 5L de solution liquide de substitution
- 4 x 500ml de solution de dextrose (pour les séquences d'amorçage)
- 2 x 1L du plasma autologue des moutons
- Un capteur pour la mesure de la pression artérielle moyenne
- 4x 50ml de billes de Manucol stériles avec 2g / 100ml de microparticules de verre dans du Ringer

II.4.3.3 Programme de monitorage

II.4.3.3.1 Conditions et programmation des essais

Le modèle choisi est celui couramment utilisé chez Gambro pour des tests de validation en rapport avec la coagulation des circuits d'hémodialyse. Les essais sont faits sur des moutons éveillés. Les animaux subissent des circulations extracorporelles répétées sur 1 à 2 semaines. La jugulaire interne est choisie comme abord vasculaire. L'anticoagulation à l'héparine est gérée par des mesures du TCA (temps de céphaline activée). 2 mL de sang sont recueillis sur tube de verre et mélangés à un activateur. Un petit aimant situé au fond du tube est entraîné dans un mouvement rotatif qui cesse quand le sang est coagulé.

Deux moutons, d'environ 80kg, ont été testés sur deux jours non consécutifs (cf. tableau 8). Les traitements ont été effectués de manière similaire pour tous les animaux et ont duré 4 heures (sauf dans un cas ou une coagulation est survenue). La restitution du sang a été faite dans tous les cas et la restitution du plasma uniquement dans les cas où il y a eu seulement l'utilisation d'une solution sérum physiologique pour l'amorçage.

Tableau 8: Codage des conditions (à gauche) et programmation des essais (à droite)

Solution de priming	
Sérum physiologique	Plasma autologue
SP	PA

Jour	Mouton A	Mouton B
Jour 1	A1 SP	-
Jour 2	-	B1 PA
Jour 3	A2 PA	-
Jour 4	-	B2 SP

II.4.3.3.2 Données systémiques

La pression artérielle moyenne a été mesurée en permanence (sauf pour le quatrième jour d'essais ou le capteur n'a pas pu être placé sur l'animal). Les échantillons de sang prélevés au niveau de la ligne d'accès sont considérés comme étant représentatifs des valeurs systémiques. Les paramètres d'intérêt sont l'hématocrite et le taux de protéines totales. Les mesures ont été faites avant l'amorçage et pendant le traitement.

II.4.3.3.3 Données concernant la circulation extracorporelle

La porosité du lit fluidisé devait atteindre 0, 45 et les bioréacteurs ont été remplis avec 20% de billes (volume de billes = 50 ml / hauteur du lit fluidisé pour un débit nul = 1,88 cm). Le volume total en fluidisation devraient donc être d'environ 65 ml (h = 2,5cm).

Le réglage du lit fluidisé s'est fait avec le débit de recirculation. Les débits initiaux ont été fixés à 180ml/min (débit du sang) et 25 ml/min (débit d'ultrafiltration) afin de s'adapter aux spécifications du plasmafiltre. Le réglage de la température du circuit a été fait au moyen d'une circulation d'eau chaude dans le dispositif Hilite. Une eau chauffée à 43 °C et traversant à 400 ml/min le Hilite devrait conduire à une température d'environ 39 °C dans les bioréacteurs (le mouton à une température interne de 39°C). Les pressions du circuit extracorporel ont été monitoré par le programme X-Lab. Des échantillons de plasma ont été prélevés pour connaitre le taux de protéines totales, et le pourcentage d'hématocrite.

II.4.3.4 Programme d'échantillonnage et d'analyse

Pour chacun des quatre traitements prévus dans le protocole, des prélèvements de sang et de plasma ont été effectués selon les tableaux suivants. Le volume total de prélèvement de sang a été d'environ 35 ml par traitement (cf. tableau 9, 10 et 11).

Tableau 9: Programme d'échantillonnage pour les données systémiques

Minutage	Site	Volume	Analyses
Avant le démarrage	Shunt / accès	1 ml de sang	Hématocrite
		2 ml de sang (plasma) x2	Protéines totales
Après le priming 5min	Accès	1 ml de sang	Hématocrite
		2 ml de sang (plasma) x2	Protéines totales
Après 15, 30, 60, 120, 240 minutes de traitement		1 ml de sang	Hématocrite
		2 ml de sang (plasma) x2	Protéines totales

Tableau 10: Programme d'échantillonnage pour le circuit extracorporel

Minutage	Site	Volume	Analyses
Si priming au plasma	Poche	2ml de plasma x 2	Protéines totales
A la fin du priming (si c'est un priming au plasma)	Entrée des bioréacteurs	2ml de plasma x 2	Protéines totales
A la fin du priming (si c'est un priming au plasma)	Sortie des bioréacteurs	2ml de plasma x 2	Protéines totales
Après 5, 15, 30, 60, 120, 240 minutes de traitement	Entrée des bioréacteurs	2ml de plasma x 2	Protéines totales
Après 5, 15, 30, 60, 120, 240 minutes de traitement	Sortie des bioréacteurs	2ml de plasma x 2	Protéines totales

Tableau 11: Résumé du nombre d'analyses

Type d'analyse	Hématocrite	Protéines totales
Nombre par traitement (total)	7 (=> n=28)	38-44 (=> n=152-176)

Les échantillons de sang (pour le dosage des protéines totales) ont été collectés dans des tubes contenant de l'anticoagulant au citrate (100 µL de 900 µL de plasma) puis centrifugés. Les échantillons de plasma ont été congelés pour une analyse ultérieure chez Gambro en utilisant l'automate ABX Pentra 400 de la société Horiba.

CHAPITRE III : **OPTIMISATION DU BIOREACTEUR A LIT FLUIDISE**

III.1 PROBLEMATIQUES LIEES AU BIOREACTEUR A LIT FLUIDISE

Dans une perspective d'application clinique, la géométrie et le mode de fonctionnement du bioréacteur à lit fluidisé hébergeant les hépatocytes doivent être affinés. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la plupart des essais *in vitro* à l'Université de Technologie de Compiègne, ont été réalisés jusqu'à présent avec un bioréacteur à petite échelle (environ 10 mL) perfusé avec du milieu de culture. Les enjeux majeurs dans cette partie sont le passage à l'échelle humaine (effet de volume) et la perfusion de plasma pathologique (effet de masse volumique). Ces deux paramètres impactent autant sur la fluidisation que sur la bioencapsulation.

Un bioréacteur dimensionné pour des traitements chez l'homme a déjà été testé avec du liquide physiologique et sans cellules à l'UTC (fig. 33 du chapitre I). Il est issu d'une première conception en lien avec le cahier des charges établi avec l'équipe du Dr. C. Selden au Royal Free Hospital (Londres, UK). Cependant, ce bioréacteur en acier inoxydable (et donc autoclavable) est volumineux et difficilement adaptable à une circulation extracorporelle complète telle que celle proposée sur la machine Prismaflex. Il convient donc de définir une enceinte conforme aux nouvelles attentes. De plus, pour l'application clinique, il devient important que le volume mort en fluidisation, aussi appelé porosité du lit fluidisé, soit minimal, car il s'agira d'un volume de plasma extérieur au patient.

Comme indiqué dans le chapitre II, le lit fluidisé se met en place dans un bioréacteur de forme cylindrique sous l'effet combiné de la perfusion d'une phase fluide qui crée une poussée vers le haut sur la phase solide, celle-ci étant entrainée en sens inverse par la pesanteur. L'équilibre est atteint en fonction essentiellement des différences de masse volumique entre ces deux phases. Le cas de la perfusion de plasma pathologique est donc à traiter spécifiquement car le plasma, de par sa concentration en protéines, a une masse volumique très proche de celle des billes d'alginate. Plus la différence de masse volumique entre le liquide et les particules en suspension est faible, plus le débit de perfusion nécessaire à l'expansion du lit est faible. Or, ce débit de perfusion du bioréacteur doit être élevé pour prendre en charge de manière efficace le patient (par des échanges accélérés et un volume de plasma total traité suffisant).

Deux solutions ont alors été envisagées : une concentration du plasma pour augmenter sa masse volumique pour pratiquer une fluidisation « inversée » ou un alourdissement des billes d'alginate à l'aide de microparticules de verre. Cette dernière solution peut alors avoir une influence sur la bioencapsulation et plus particulièrement sur la fonctionnalité des cellules encapsulées.

Enfin, le passage à l'échelle humaine nécessite aussi de pouvoir produire en masse des billes d'alginate contenant des cellules fonctionnelles. Cela impose d'étudier et de valider un certain nombre de choix en termes de stérilité et de fabrication des billes hébergeant des cellules.

Dans ce chapitre, suivant les différentes étapes présentées dans la Figure 80, nous présenterons dans un premier temps la géométrie du bioréacteur, en comparant le comportement du lit fluidisé sous cette nouvelle configuration aux résultats obtenus précédemment à plus petite échelle. Puis, nous définirons dans quelles conditions de perfusion ce bioréacteur peut être utilisé avec du plasma pathologique. Nous analyserons ensuite l'impact de l'alourdissement sur les propriétés mécaniques et biologiques des billes, avant enfin de nous intéresser aux procédés à mettre en œuvre pour produire en grand nombre ces billes pour une future application clinique.

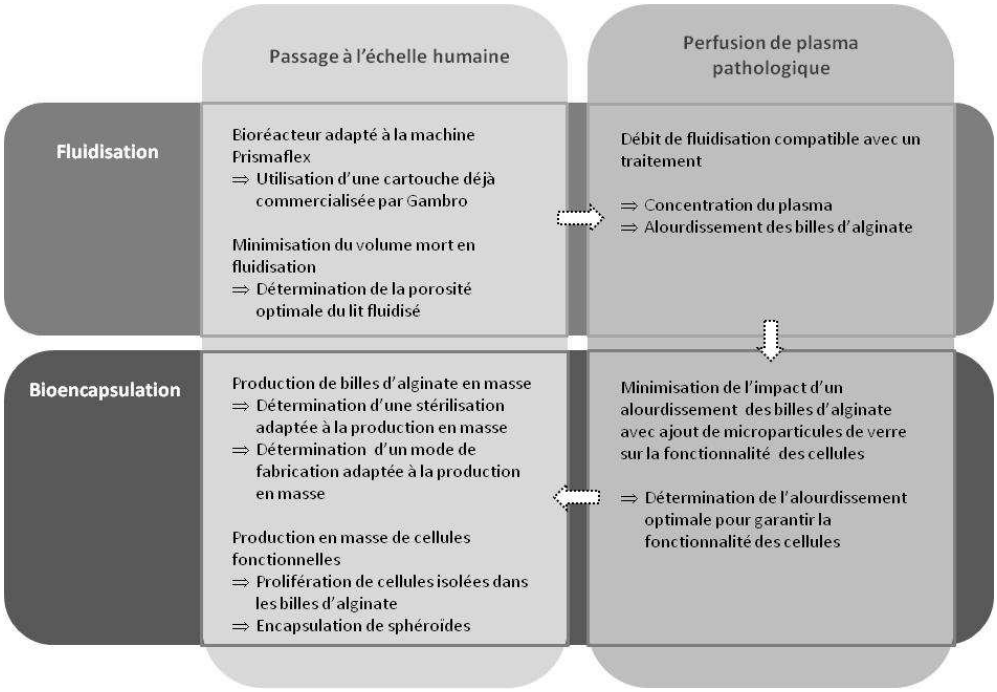


Figure 80: Schéma récapitulatif des exigences rencontrées pour le passage à l'échelle humaine et la perfusion de plasma pathologique et des solutions à étudier

III.2 PASSAGE A L'ECHELLE HUMAINE ET FLUIDISATION

Le but des travaux suivants a été, dans un premier temps, de tester des designs de bioréacteurs plus adaptables à la machine Prismaflex pour le passage à l'échelle humaine. Dans un second temps, la fluidisation à grande échelle, dans le bioréacteur choisit, a été comparée à celle à petite échelle et aux modèles théoriques de fluidisation. La caractérisation du lit fluidisé se fait en calculant la porosité de celui-ci (ou volume mort) par observation de son expansion ou hauteur finale (cf. II.2). Enfin, on s'est attaché à maximiser le remplissage du bioréacteur tout en maintenant une fluidisation optimale.

III.2.1 Choix du bioréacteur et recherche des conditions optimales de fluidisation

III.2.1.1 Essais sur deux colonnes commercialisées

Le bioréacteur doit être de géométrie tubulaire et permettre une expansion correcte du lit de billes lors de la fluidisation. Il doit aussi être assez volumineux pour pouvoir contenir un nombre important de billes et ainsi héberger un nombre important de cellules pour garantir une thérapie efficace. A partir des données de la littérature, et sans préjuger de l'efficacité in vivo du foie bioartificiel à lit fluidisé, il parait réaliste de dimensionner le système final pour héberger environ 1000 mL de billes d'alginate. (cf. I.5.1.1).

Avant de partir sur une conception nouvelle, deux colonnes déjà commercialisées pour d'autres applications ont été testées avec des billes vides dans du liquide physiologique: la cartouche d'adsorbant du système MARS et la cartouche d'hémoperfusion ENSO, décrites en détail dans la section Matériels et Méthodes. En adaptant quelque peu le support destiné à la machine Prismaflex, il est possible d'inclure facilement une ou plusieurs de ces cartouches dans une circulation extracorporelle (cf. figure 81). De plus, ces dispositifs ont l'avantage d'avoir été développés et qualifiés pour une production industrielle.

La cartouche MARS donne de bons résultats de fluidisation. La montée du lit est homogène et l'expansion est importante. Les billes ont bien un mouvement de fluidisation : amenées par la perfusion, elles montent au centre de la cartouche puis sédimentent au niveau des parois (cf. figure 82 et 84). De plus, la cartouche est facilement manipulable et démontable du fait qu'elle met en œuvre des embouts vissés. Dans le cas de la cartouche ENSO, le lit fluidisé ne se forme pas et ce malgré l'ajout d'un répartiteur de flux à quatre sorties (cf. figure 67 II.4.3.1).

Seules quelques billes sont projetées vers le haut mais la hauteur du lit ne change pratiquement pas et l'expansion est donc très faible (cf. figure 82 et 84). Ceci est sans doute dû au fait de son design légèrement conique.

De plus, l'étanchéité n'est pas bonne car elle se fait en assemblant les pièces de la cartouche en force et l'apparition de bulles d'air est notée. La cartouche est normalement scellée thermiquement en chauffant les joints en plastique à ses extrémités (cf. figure 83). Les billes ont été contrôlées avant et après fluidisation. Elles n'ont pas été endommagées par les manipulations. Le diamètre des billes est constant d'une expérience à l'autre (1,35mm de moyenne).

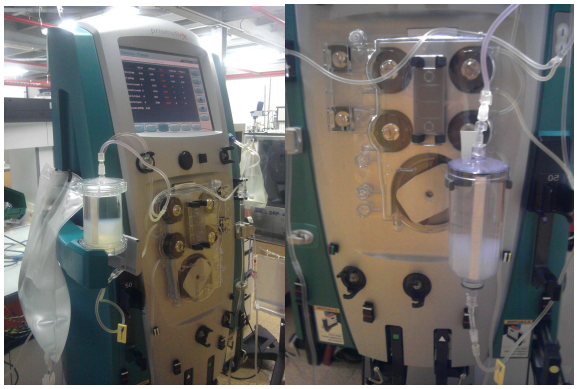


Figure 81 : Montages sur des cassettes Prismaflex de la cartouche MARS à gauche et de la cartouche ENSO à droite.

Figure 82: A gauche : Fluidisation au sein de la cartouche MARS. A droite : Fluidisation au sein de la cartouche ENSO (Débit = 100ml/min)

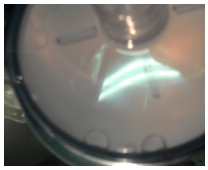


Figure 83 : Des bulles d'air se forment près du joint de la cartouche ENSO signe d'une perte d'étanchéité

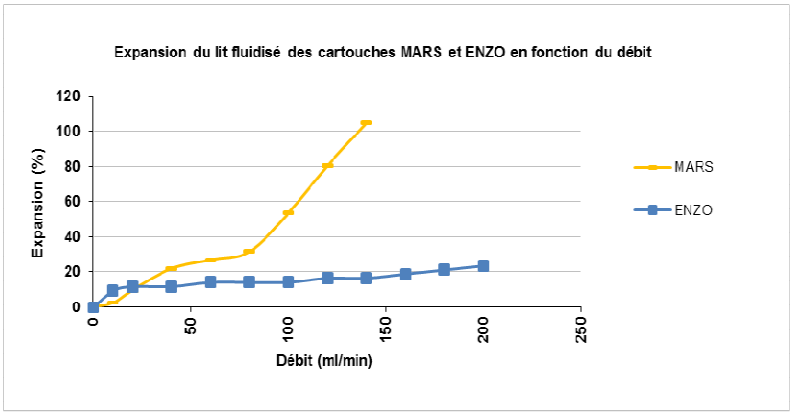


Figure 84: Expansion du lit fluidisé dans les cartouches MARS et ENSO en fonction du débit

Cette expérience a permis d'écarter la possibilité d'utiliser la cartouche ENSO en tant que bioréacteur. En effet, la fluidisation est quasiment inexistante dans cette cartouche. Au contraire, la cartouche MARS s'est révélée être une possibilité très intéressante. Nous avons donc poursuivi les expérimentations avec cette cartouche.

III.2.1.2 Impact de l'ajout d'un répartiteur

Dans les bioréacteurs précédents à grande échelle, un répartiteur de flux en entrée du bioréacteur avait montré son intérêt pour homogénéiser l'expansion des billes. La fluidisation des billes d'alginate a été testée dans la cartouche MARS avec un répartiteur à trois sorties et sans répartiteur. Les billes utilisées étaient des billes d'un diamètre de 1,35mm environ (soit une taille un peu plus grande que celles généralement produites). Sous un débit de 100ml/min, l'effet du répartiteur sur la fluidisation s'observe bien : sans répartiteur, la surface du lit est très inhomogène, l'élévation des billes forme un dôme ; avec répartiteur, la surface du lit est plane et homogène et, pour un même débit, l'expansion est bien plus élevée. Le répartiteur apporte une nette amélioration à la qualité de la fluidisation et a donc été conservé lors des manipulations suivantes (cf. figure 85 et 86).

Figure 85: Fluidisation à 100ml/min au sein d'une cartouche MARS. A gauche: Sans répartiteur. A droite: Avec répartiteur.

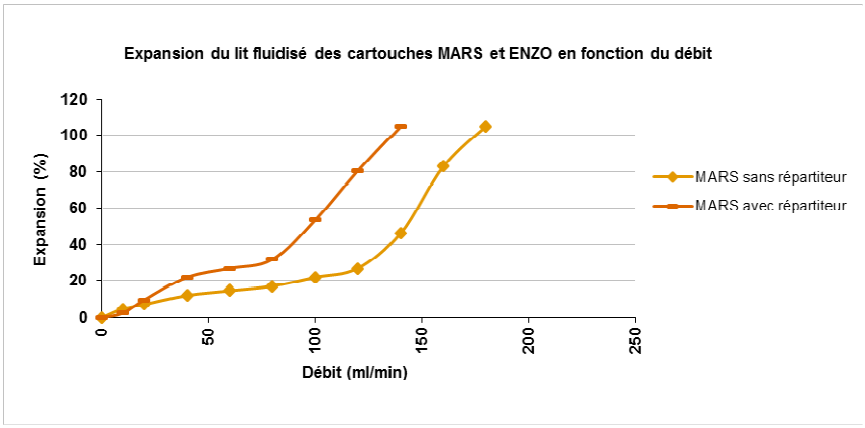


Figure 86: Expansion du lit fluidisé de la cartouche MARS avec ou sans répartiteur en fonction du débit

III.2.1.3 Recherche d'une fluidisation optimale

Une expérience de fluidisation a été faite dans du liquide physiologique de type Ringer avec des billes toutes justes fabriquées et colorées pour une meilleure visualisation du lit fluidisé. L'expansion est facilitée du fait du diamètre plus petit des billes (850nm ce qui est souhaitable) (cf. figure 87). La cartouche MARS a été équipée du répartiteur de flux.

Même pour de faibles débits (10 ml/min) toutes les billes sont en mouvement et aucune zone de stagnation n'est observée. Les débits de fluidisation obtenus se situent dans une gamme qui peut être compatible avec les possibilités de perfusion d'une plasmaphérèse (quelques dizaines de mL/min, sans recirculation du plasma).

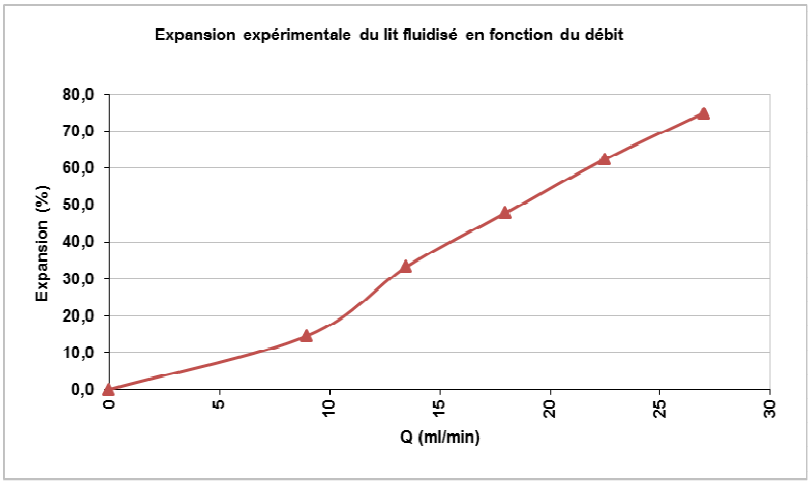


Figure 87: A gauche: Fluidisation à 20ml/min dans une cartouche MARS contenant des billes tout juste fabriquées. A droite : Expansion du lit fluidisé dans la cartouche MARS en fonction du débit.

Un suivi des pressions à l'entrée et à la sortie du bioréacteur a été réalisé pour un débit de 25ml/min. La perte de charge se stabilise à environ 2mmHg ce qui est très faible.

La cartouche MARS semble donc optimale pour une utilisation en tant que bioréacteur.

III.2.2 Effet du changement d'échelle sur la fluidisation

Des essais ont été réalisés dans le but de mieux caractériser la fluidisation dans la cartouche MARS. La fluidisation observée dans les bioréacteurs de 8 ml utilisés à l'Université de Technologie de Compiègne pour les essais de culture cellulaire (Fig. 88) a été comparée à celle obtenue dans la cartouche MARS de 250ml (Fig. 89). Des billes vides d'environ 900 microns ont été perfusées dans du liquide physiologique de type Ringer à température ambiante. Les porosités du lit fluidisé obtenues lors des fluidisations expérimentales ont été comparées entre elles et à celles calculées grâce à des modèles théoriques décrits dans la partie Matériels et méthodes. Il ressort que les modèles de Foscolo et de Richardson et Zaki sont bien adaptés aux expérimentations réalisées. Les modèles de Ganguly et Hinata et Bulos n'ont pas été utilisés car ils ne sont fiables que pour des porosités très faibles.

Les modèles de Richardson et Zaki et de Foscolo ont tendance à bien simuler la fluidisation obtenue à petite échelle. Pour la fluidisation à grande échelle avec la cartouche MARS, les modèles théoriques, appliqués dans les mêmes conditions qu'avec les petits bioréacteurs sous-estiment la porosité expérimentale de 20 à 30%.

En effet, si on compare les comportements des lits fluidisés de façon adimensionnelle (Fig. 90), il apparait que la porosité du lit dans les bioréacteurs de grand diamètre (5,8 cm) est plus élevée que celle dans les bioréacteurs de petit diamètre (1,1 cm). Dans les deux configurations, tous les paramètres sont pourtant identiques : même liquide de perfusion et même température donc même masse volumique et même viscosité de la phase fluide, et même billes donc même masse volumique et taille de la phase solide.

Cette différence de comportement peut s'expliquer par le fait que les effets de bord sont moins importants dans le grand bioréacteur. En effet, le rapport du diamètre de la particule sur le diamètre du bioréacteur (dp/D) est environ égal à 0,02 alors qu'il est environ égal à 0,1 pour les petits bioréacteurs de laboratoire. Le calcul de la vitesse terminale de chute, qui dépend des effets de bord, et qui influence l'expansion du lit, serait donc à revoir au cas par cas pour disposer de modélisations plus fiables (cf. Chapitre II.2.2).

Dans une démarche pragmatique, et pour la problématique du changement de bioréacteur, nous utiliserons pour la suite l'abaque de la figure 91 qui donne les correspondances entre les débits de perfusion entre les deux tailles de bioréacteur pour obtenir des expansions de lit équivalentes, dans la gamme qui nous intéresse.

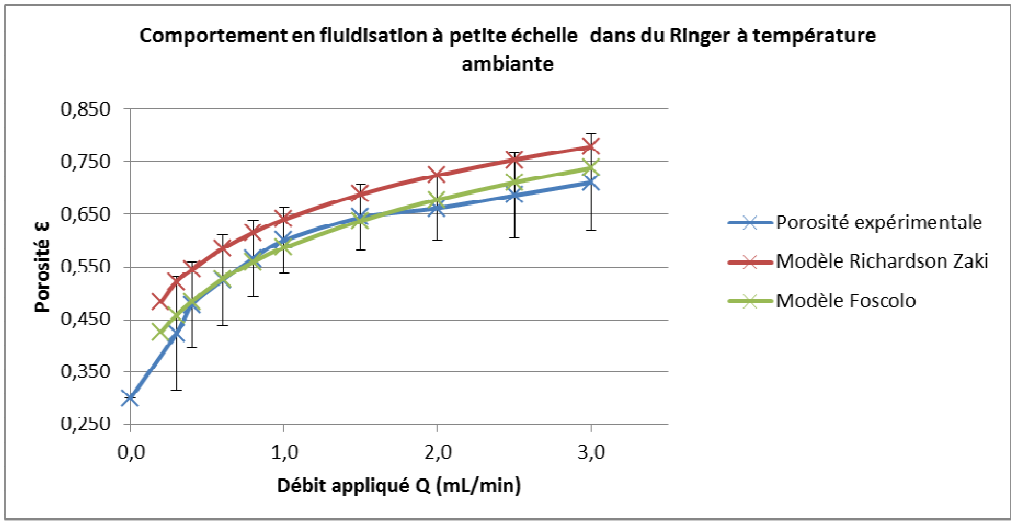


Figure 88: Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur de petit volume remplit avec des billes vides dans du Ringer à température ambiante (n=3)

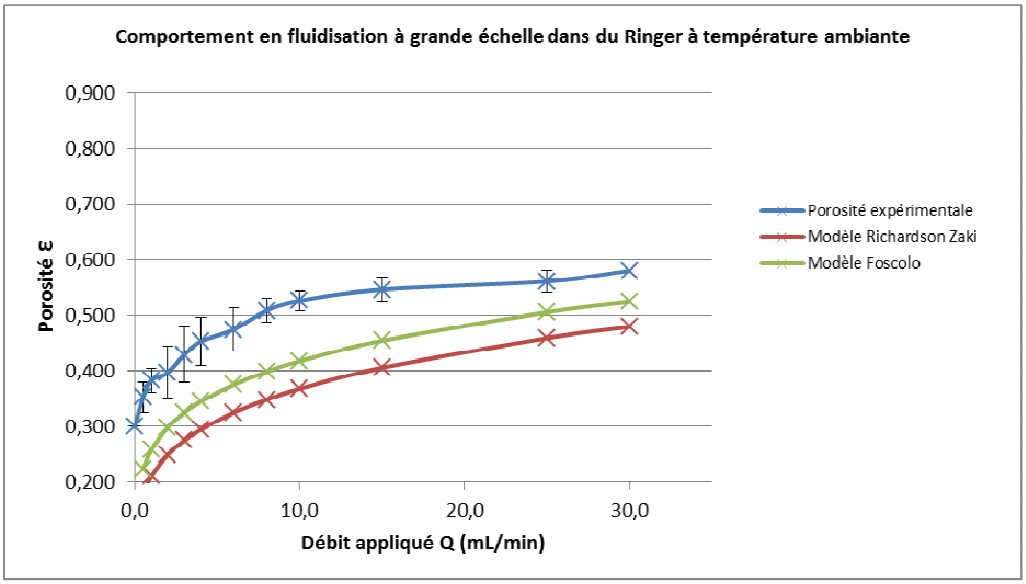


Figure 89: Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur MARS remplit avec des billes vides dans du Ringer à température ambiante (n=3)

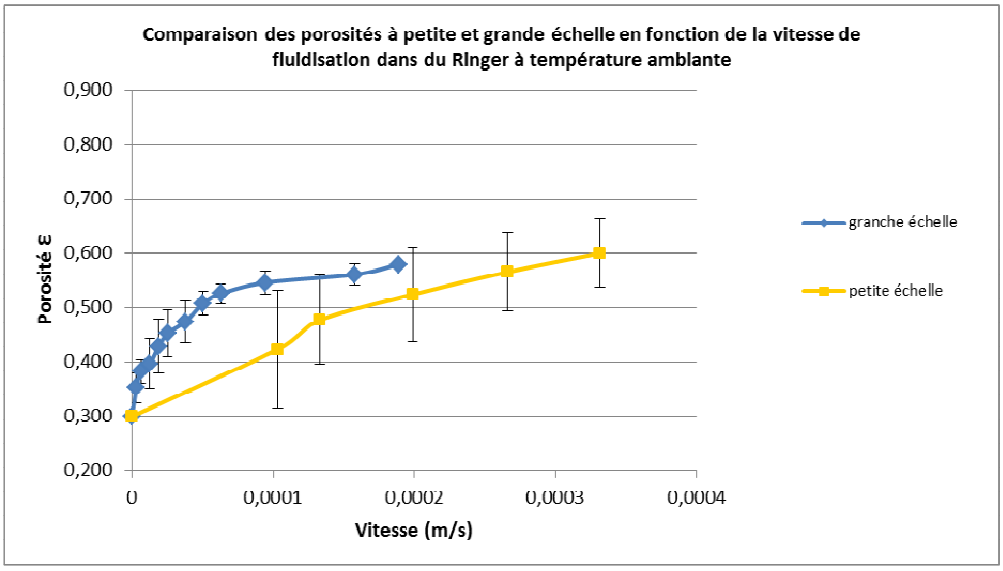


Figure 90 : Comparaison des porosités à petite et grande échelle en fonction de la vitesse de fluidisation dans du Ringer à température ambiante (n=3)

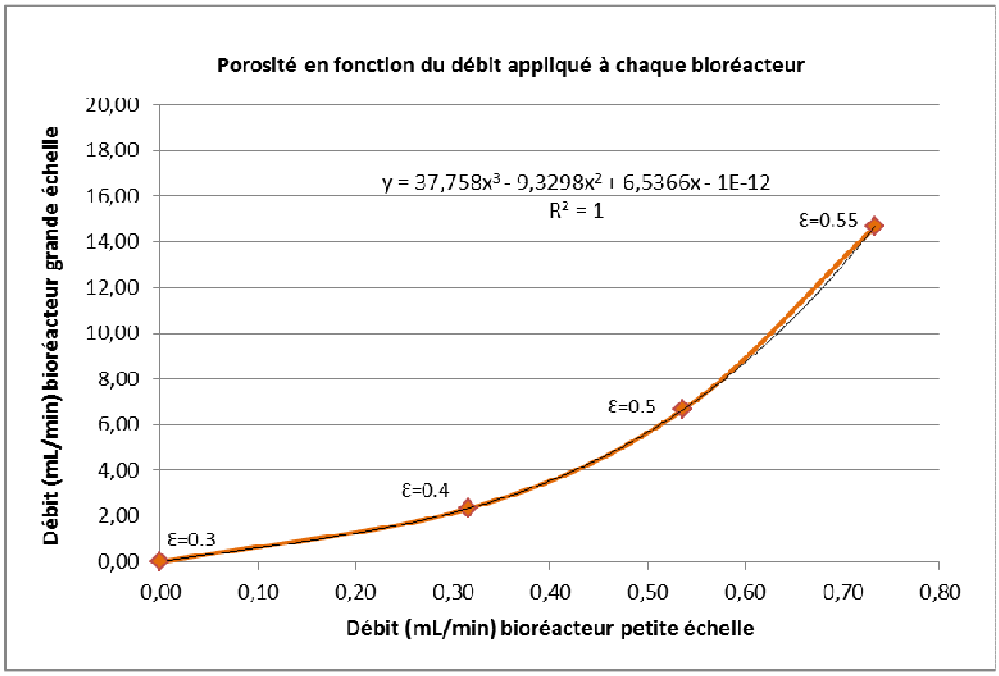


Figure 91: Mise en rapport des débits obtenus à petite et grande échelle pour des porosités de lit fluidisé équivalentes (n=3)

III.2.3 Influence de la porosité du lit fluidisé sur la fonctionnalité de sphéroïdes de C3A encapsulés

Un autre axe d'optimisation de la fluidisation concerne la quantité de billes que peut héberger un bioréacteur. Afin de maximiser le nombre de cellules au sein du bioréacteur, il conviendrait de minimiser la porosité du lit pour pouvoir augmenter le taux de remplissage du bioréacteur. Il faut cependant maintenir une fluidisation correcte c'est-à-dire à même d'assurer une bonne fonctionnalité des cellules. Jusqu'à présent, les essais *in vitro* à petite échelle se sont basés sur un rapport ½ entre volume de lit tassé et volume du bioréacteur, ce qui correspond à une porosité du lit fluidisé de 0,6. Des essais à petite échelle ont été réalisés en comparant deux porosités : 0,45 et 0,6. Les billes ont été fabriquées avec une densité cellulaire de 20 millions (M) de cellules C3A en sphéroïdes par ml d'alginate (cf. figure 92). Des bioréacteurs de petit volume ont été utilisés pour limiter le nombre de cellules à cultiver suivant les protocoles décrits dans le Matériel et méthodes (cf. figure 93). Les fluidisations ont été obtenues dans du SVF dilué de moitié dans du liquide physiologique. Des aliquots de surnageant ont été prélevés en début et fin d'expérience de fluidisation (au bout de 6 à 8 heures).

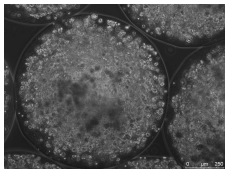


Figure 92: Observation au microscope des billes utilisées pour l'étude de l'impact de la porosité de lit fluidisé sur la fonctionnalité de sphéroïdes de C3A encapsulés

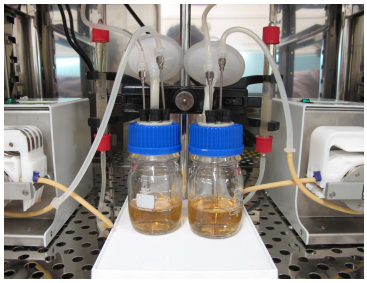


Figure 93: Expérience de fluidisation. A gauche: Le lit à une porosité de 0,45. A droite : Le lit à une porosité de 0, 6.

Pour les deux conditions de porosité, les résultats de consommation de glucose et de production d'albumine sont très similaires.

La production d'urée s'avère par contre augmentée lors d'une fluidisation à une porosité de 0,45 par rapport à une fluidisation à une porosité de 0,6 (non significatif). Cependant, ce paramètre est assez instable, du fait du manque de précision des dosages, et n'est donc pas le plus pertinent (cf. figure 94).

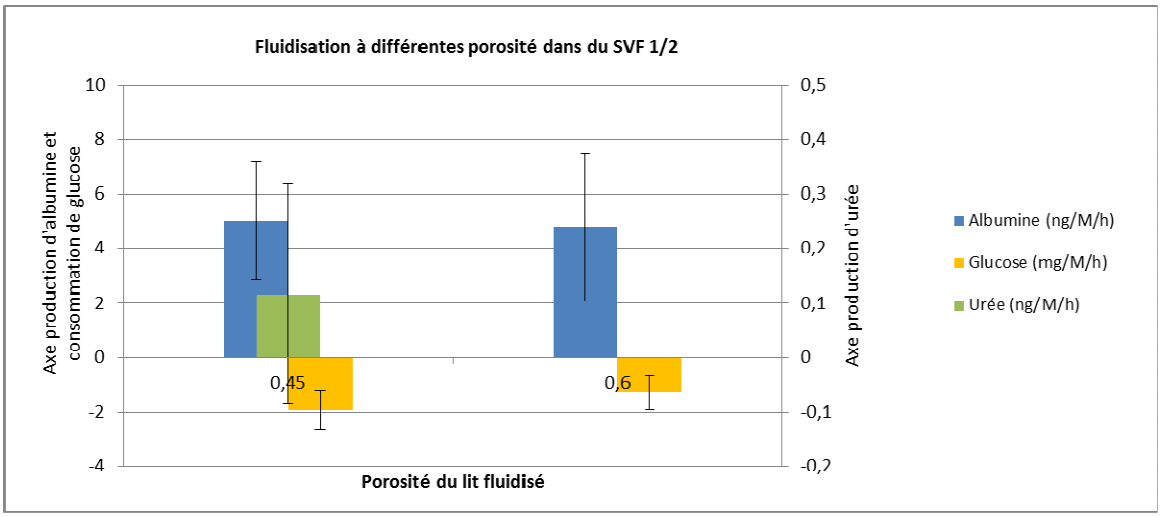


Figure 94: Résultats de consommation de glucose et de production d'albumine et d'urée de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés en fonction de la porosité du lit fluidisé (n=3)

Un lit fluidisé d'une porosité de 0,45 semble avoir des capacités métaboliques similaires à un lit fluidisé d'une porosité de 0,6. Le plus faible débit de perfusion ne semble donc pas engendrer une diminution délétère des transferts de nutriments ou d'oxygène pour les cellules encapsulées. Utiliser une porosité de 0,45 pourrait donc permettre de maximiser le volume de billes dans le bioréacteur. Concernant la cartouche MARS, pour une porosité de 0,6, seulement 125ml de billes en lit tassé pourrait être mise à fluidiser dans le bioréacteur. Si la porosité du lit fluidisé est abaissée à 0,45, il peut être envisagé de mettre 160ml de billes en lit tassé dans la cartouche soit une augmentation du volume de plus de 25%.

III.2.4 Bilan

Dans cette première partie, nous avons donc validé le choix d'utiliser des cartouches vides MARS comme bioréacteurs à lit fluidisé. Nous disposons ainsi de colonnes déjà commercialisées et validées sur le plan réglementaire (dispositif à usage unique) qui peuvent potentiellement héberger 125 à 160 mL de billes d'alginate. Nous verrons plus tard dans le chapitre IV comment elles pourront être déployées dans la circulation extracorporelle complète. Dans cette première partie, nous avons montré que le comportement du lit fluidisé à grande échelle pouvait aisément être calqué sur celui obtenu avec les colonnes de 8 mL utilisées lors des précédents essais *in vitro* au laboratoire, et que les modèles de comportement restent valables avec du sérum physiologique.

III.3 PERFUSION DE PLASMA PATHOLOGIQUE ET FLUIDISATION

Des essais à grande échelle avec du plasma visent à comparer la fluidisation à celle obtenue dans du liquide physiologique. La différence de masse volumique entre la phase fluide et la phase solide est cruciale pour la mise en œuvre de la fluidisation. Nous avons donc souhaité prendre en compte dès le début la problématique de la variabilité inter-patients, qui ne devra pas perturber l'approche globale de fluidisation proposée.

III.3.1 Fluidisation à grande échelle dans du plasma bovin avec simulation de la variabilité inter-patients

La variabilité inter-patients a pu être simulée en diluant plus ou moins le plasma de départ. Trois types de plasma ont été obtenus à partir des dilutions: un plasma avec une concentration de 45g/L en protéines totales (hypo protéinémie : simulation d'un patient en insuffisance hépatique), un plasma à 20g/L (hypo protéinémie très sévère) et un plasma à 70g/L (taux dans la norme située entre 65g/L et 80g/L). Le plasma est maintenu à 37°C grâce à des bains thermostatés (cf. figure 95).

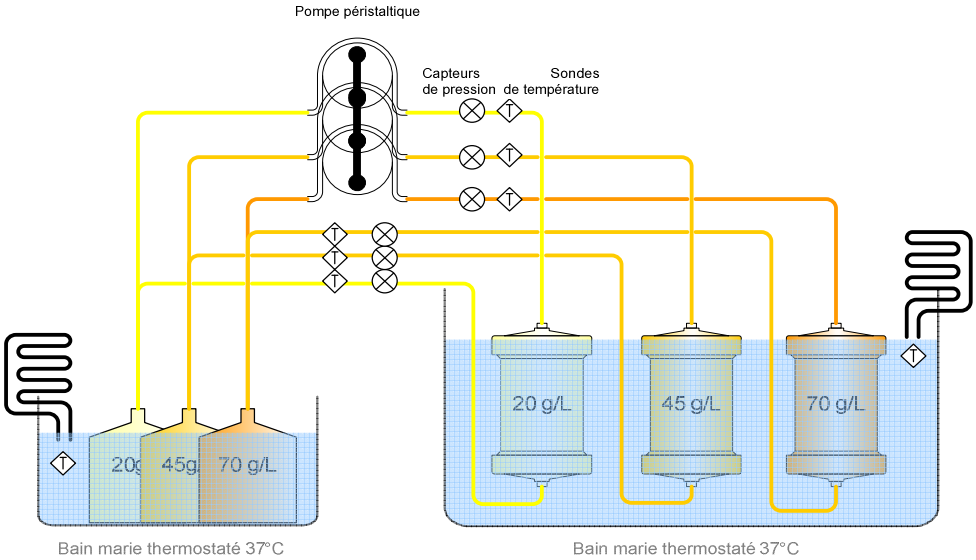


Figure 95 : Schéma de l'expérience de fluidisation au plasma avec simulation de la variabilité inter-patients

Comme attendu, le mouvement de fluidisation dépend beaucoup de la différence de masse volumique entre le liquide et les billes (cf. figure 96).

Les masses volumiques des trois plasmas préparés ont été mesurées et sont relativement proches (de 1002 kg. m-^{3} à 1016 kg.m-^{3}). Cependant, les résultats de fluidisation sont très variables : les billes flottent dans du plasma à 70g/L et sédimentent dans du plasma à 45g/L. On peut donc estimer que les billes d'alginate ont une masse volumique comprise entre 1011 et 1015 kg.m-3.

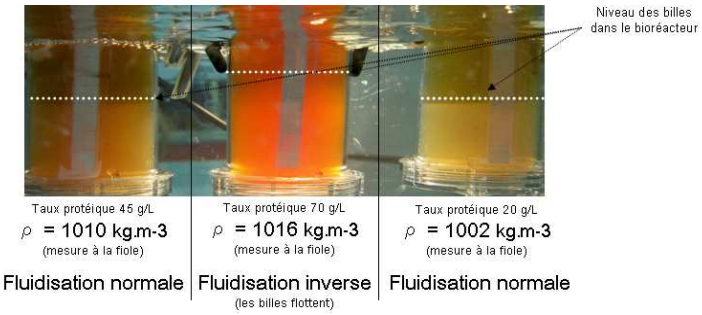


Figure 96: Lits tassés de billes d'alginate obtenus à débit nul dans du plasma avec une simulation de la variabilité inter-patients

Si ρ billes < ρ fluide les billes flottent et on peut faire une fluidisation inverse en inversant le sens de la perfusion (du haut vers le bas) comme cela est décrit par Karmamenev et Nikolov en 1992 [103].

Plus la différence de masse volumique est élevée plus les débits de perfusion doivent être forts pour générer le mouvement de fluidisation. Pour des plasmas à 45g/L et à 70g/L, aucune mesure de montée ou de descente du lit n'a pu être réalisée car dès 5ml/min le lit était déjà complètement fluidisé. Pour le plasma à 20g/L, la fluidisation est totale à 10ml/min.

La fluidisation, dans ces conditions, est difficilement envisageable car les masses volumiques des plasmas sont trop proches de celle des billes d'alginate. D'autant plus que le patient en insuffisance hépatique va se retrouver, si le traitement fonctionne (synthèse d'albumine par les cellules du foie bioartificiel), avec un plasma qui possèdera une masse volumique de plus en plus élevée. Les débits de fluidisation sont dans tout les cas trop faibles pour correspondre à des débits de traitement. En effet, pour que la thérapie soit efficace il faut que les débits soient assez élevés pour traiter tout le volume plasmatique du patient (environ 3 à 4L) en un temps assez court (quelques heures).

Deux solutions sont alors possibles : augmenter la masse volumique des billes en ajoutant des microparticules plus denses dans la solution d'alginate ou augmenter la masse volumique du plasma, en le concentrant en amont grâce à un filtre, pour réaliser une fluidisation « inversée ». Nous avons donc poursuivi nos investigations de manière à envisager la mise en place de ces deux solutions.

III.3.2 Fluidisation inversée à grande échelle dans du plasma de bovin concentré

Chaque patient, suivant sa pathologie, peut avoir une masse volumique plasmatique différente. On a vu que ce paramètre est primordial pour piloter le comportement du lit fluidisé. Une étape de concentration du plasma extrait par plasmaphérèse pourrait permettre de générer une différence de masse volumique suffisamment élevée pour envisager la fluidisation inversée, c'est-à-dire une perfusion de la colonne de haut en bas avec un flux descendant de la phase fluide qui viendrait à l'opposé du phénomène de flottaison.

Pour concentrer le plasma, un filtre de dialyse (HF20) a été utilisé. La faction filtrée extraite a été de 20% (50ml/min de débit de plasma et 10ml/min de débit de filtration). Le plasma a été concentré, jusqu'à atteindre une concentration en protéines totales de 135g/L, pour qu'il ait une masse volumique suffisante pour que la fluidisation inverse soit possible (environ 1030kg.m-3). A partir de ces mesures, et des précédentes (cf. II.2.2), il a été possible d'établir une relation entre la masse volumique du plasma et sa concentration protéique (Fig. 97).

$$\rho \text{ plasma} = 996 + 0{,}28 \times Cp \text{ ; avec } \rho \text{ en kg.m-}^{3} \text{ et Cp en g.L-1 ou kg.m-}^{3}$$

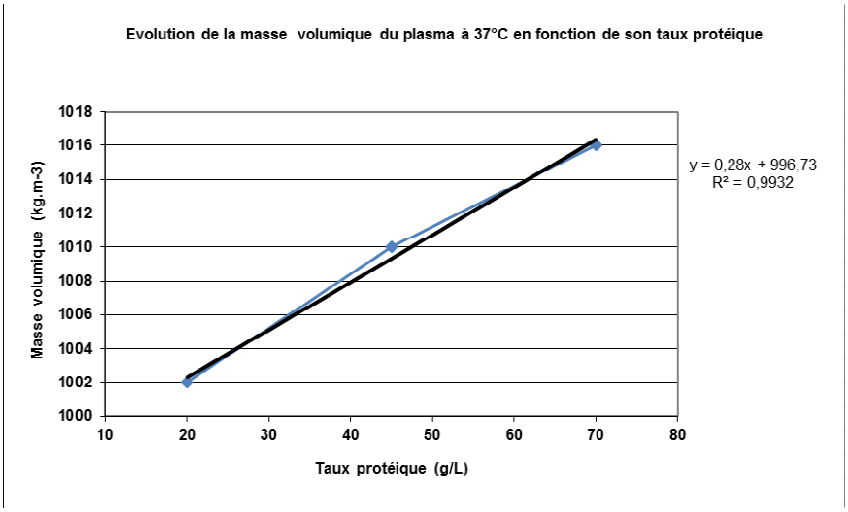


Figure 97: Evolution de la masse volumique du plasma à 37°C en fonction de sa concentration de protéines totales.

Le plasma concentré a ensuite été utilisé pour une manipulation de fluidisation inverse avec 50ml de billes d'alginate vides en lit tassé. Le bioréacteur a été maintenu à 37°C dans un bain thermostaté. Pour un débit de fluidisation nul, les billes flottent bien en lit tassé en haut du bioréacteur. La porosité initiale du lit est très légèrement inférieure à 0,3 (cf. figure 98).

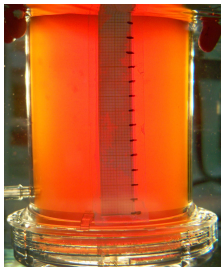


Figure 98: Manipulation de fluidisation inverse à débit nul (Le lit est tassé en haut du bioréacteur)

Le plasma concentré a provoqué des difficultés dans la mise en œuvre de l'expérimentation. En effet, lors de la mise en place de la perfusion du haut vers le bas, on observe que la forte concentration protéique crée des amas visqueux de fibrine qui viennent perturber la fluidisation au sein du bioréacteur. De plus, le plasma mousse beaucoup ce qui engendre des problèmes de répartition du flux à l'entrée du bioréacteur. Enfin, la couleur très sombre du plasma concentré associée à la transparence des billes d'alginate fait qu'il est très difficile de visualiser les billes lors de la fluidisation (cf. figure 99).

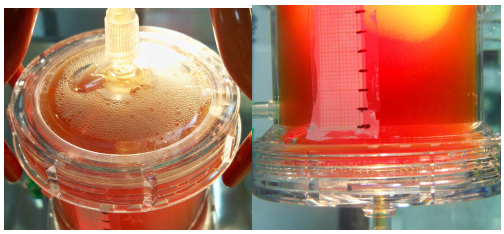


Figure 99: Manipulation de fluidisation inverse. A gauche : Présence de mousse à l'entrée du bioréacteur. A droite: Difficultés de visualisation de la hauteur du lit fluidisé.

Pour un débit de 25ml/min, débit pour lequel la fluidisation dans du liquide physiologique est optimale avec une expansion du lit de 60%, la hauteur du lit fluidisé n'est pas mesurable. Les billes sont en mouvement mais celles-ci ne forment pas un lit avec une surface régulière et plane comme dans le cas d'une fluidisation non inversée.

Le comportement du plasma concentré semble donc être un frein trop important pour envisager le développement de la fluidisation inverse dans le cadre d'une thérapie telle que la thérapie SUPPLIVER. De plus, la gestion d'une fluidisation inverse induit des complexifications importantes dans la conception de la circulation extracorporelle.

III.3.3 Alourdissement des billes avec des microparticules de verre

L'alternative consiste donc à alourdir les billes en y incluant des particules de masse volumique importante. Un alourdissement des billes, à l'aide de microparticules de verre, avait déjà été testé à l'Université de Technologie de Compiègne pour son usage au Royal Free Hospital (Dr Selden). Cette approche doit être reproduite et adaptée pour la géométrie actuelle du bioréacteur.

III.3.3.1 Calcul de la masse de microparticules à inclure

Comme vu précédemment lors d'une fluidisation dans du liquide physiologique, les différences de masses volumiques entre le fluide et les billes sont assez importantes pour obtenir des débits de fluidisation compatibles avec un traitement. Nous cherchons donc à reproduire ces conditions.

Les différences de masses volumiques entre les billes d'alginate et le liquide de Ringer à 22°C ont été estimées en moyenne à 17,5 $kg.m^{-3}$, par une approche inverse corrélant les expansions de lit obtenues expérimentalement au modèle de Richardson et Zaki.

En incluant la variabilité inter-patients et celle due à la mesure des masses volumiques, une augmentation d'environ 12,5 $kg.m^{-3}$ de la masse volumique des billes semble souhaitable, ce qui correspond à une masse volumique des billes aux alentours de 1030 $kg.m^{-3}$. A partir de cette conclusion, il a fallu calculer le pourcentage de microparticules de verre à ajouter à la préparation d'alginate pour arriver à alourdir les billes jusqu'à la masse volumique visée.

Une méthode de calcul, applicable quels que soit les paramètres décrivant les billes d'alginate ou les microparticules alourdissantes employées, a donc été mise en place. Un tableau Excel (cf. Annexe 1) permet d'établir, pour chaque préparation d'un volume V de billes d'alginate, la masse de microparticules à inclure. Dans l'exemple présenté, on souhaite connaitre la masse de microparticules de verre de diamètre moyen 20 µm à inclure dans l'alginate sous forme liquide avant formation des billes qui se rétractent lors de la phase de gélification. D'après les calculs, il conviendrait d'ajouter environ 1,24g de microparticules de verre pour 100ml de solution d'alginate liquide pour obtenir une masse volumique finale de 1030 $kg.m^{-3}$.

III.3.3.2 Fluidisation à petite échelle dans du SVF

Des billes sans cellules de 1 mm de diamètre ont été placées pour une fluidisation dans du SVF à 37°C ou dans du liquide physiologique (Ringer) à température ambiante. Deux alourdissements (1,25 et 2g/100ml d'alginate) ont été testés.

Les résultats expérimentaux obtenus ont été comparés à ceux générés par les modèles de Richardson et Zaki et de Foscolo (Fig. 100 et Fig. 102), en appliquant les masses volumqiues calculées pour les deux ajouts de microbilles de verre.

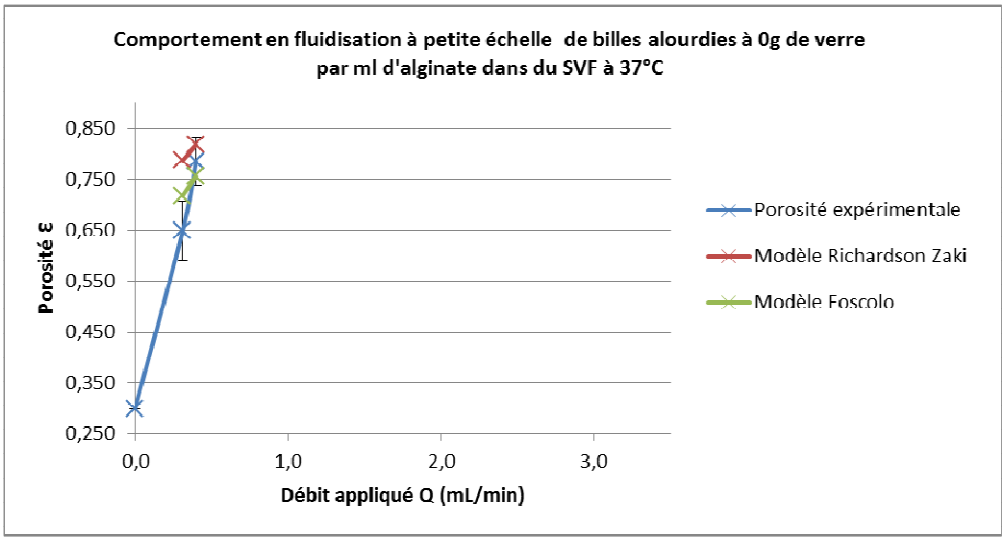


Figure 100: Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur de petit volume remplit avec des billes vides dans du SVF à 37°C (n=3)

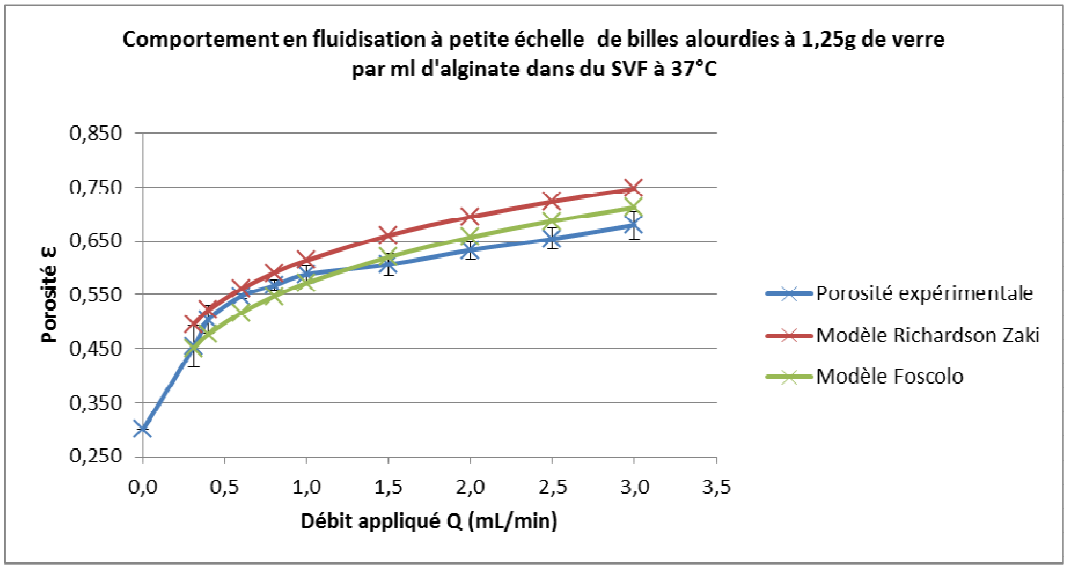


Figure 101: Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur de petit volume remplit avec des billes alourdies à 1,25g/100ml dans du SVF à 37°C (n=3)

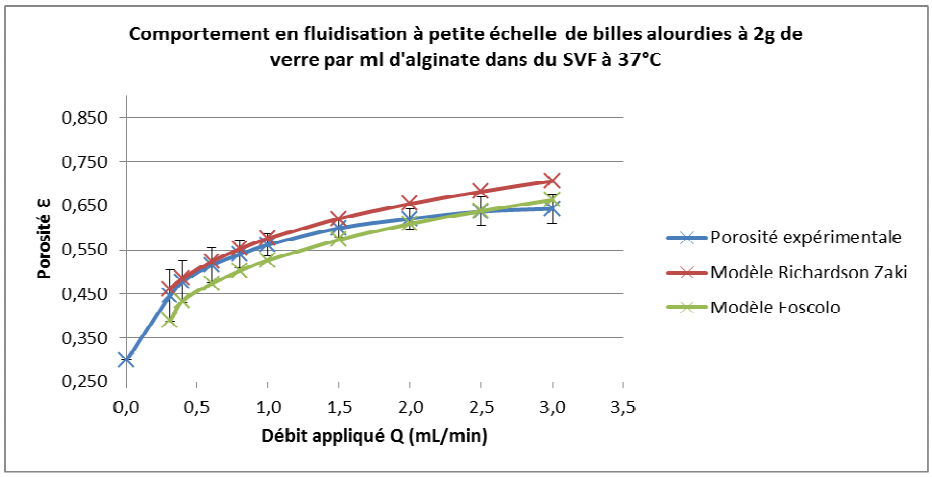


Figure 102: Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur de petit volume remplit avec des billes alourdies à 2g/100ml dans du SVF à 37°C (n=3)

Quelque soit l'alourdissement, les modèles de Richardson et Zaki et de Foscolo ont tendance à bien simuler la fluidisation obtenue.

En comparant les fluidisations entre elles, un alourdissement apparait de nouveau comme indispensable (cf. figure 103). En effet, l'expansion du lit fluidisé avec des billes vides dans du SVF à 37°C est très élevée pour de très faibles débits.

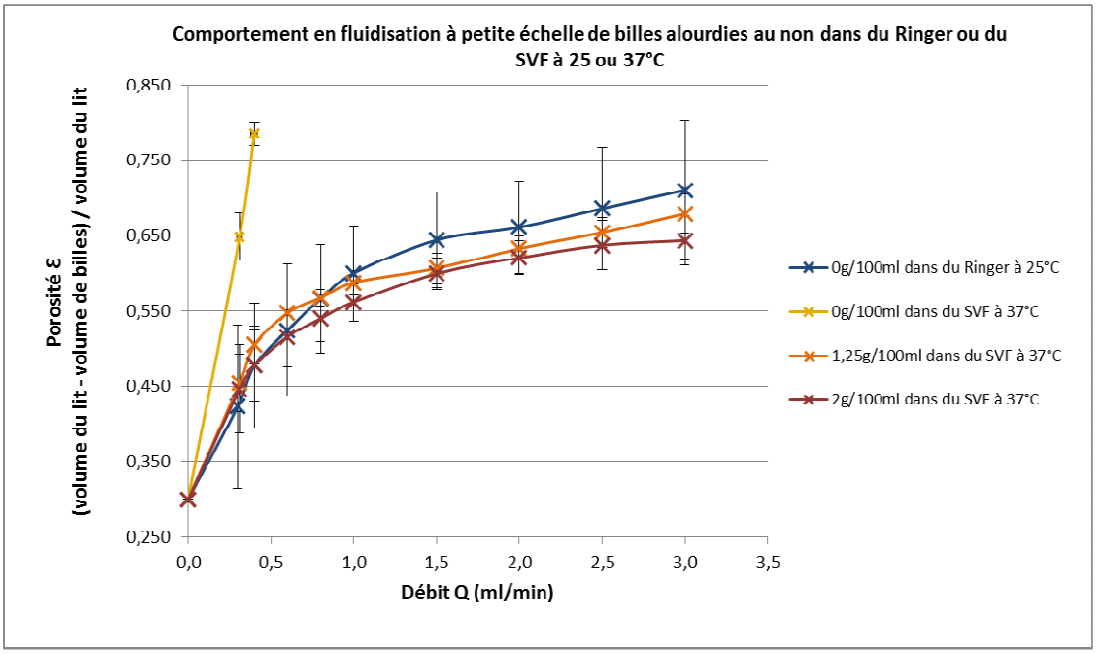


Figure 103 : Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur de petit volume remplit avec des billes alourdies ou non dans du Ringer ou du SVF (n=3)

De plus, notre approche est validée puisqu'un alourdissement de 1,25g/100ml provoque une fluidisation dans du SVF similaire à celle des billes vides dans du Ringer à température ambiante. Il faut cependant faire des tests complémentaires à grande échelle avec du plasma et en alourdissant les billes pour confirmer les résultats obtenus.

III.3.3.3 Fluidisation à grande échelle dans du plasma bovin

50ml de billes alourdies (1,25g/100ml de microparticules de verre) ont été mises en fluidisation dans du plasma à 45g/L de protéines totales (concentration équivalente à celle d'un patient en insuffisance hépatique) ce qui correspond à une masse volumique d'environ 1010kg.m-^{3}.

Pour un débit nul, les billes forment un lit tassé en bas du bioréacteur d'une hauteur d'environ 2,5cm soit une porosité d'environ 0,3. L'alourdissement à 1,25g /100ml produit des conditions de fluidisation assez proches de celles observées dans du liquide physiologique (cf. figure 104 et 105).

Figure 104: Expériences de fluidisation dans du plasma de bœuf à un débit de 25ml/min

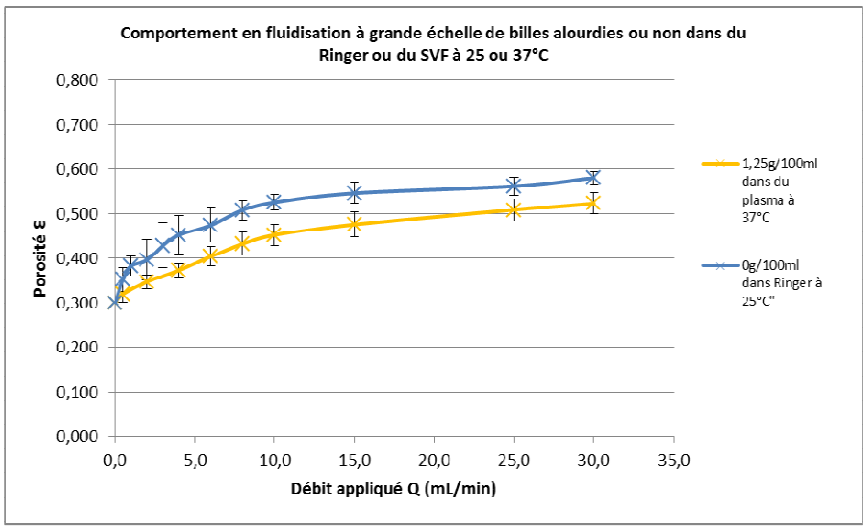


Figure 105: Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur MARS remplit avec des billes alourdies (1,25 g de microparticules de verre pour 100 ml d'alginate) dans du plasma de bœuf à 37°C (n=3)

Les billes ont été observées au microscope après la manipulation. Leurs formes et leurs tailles (0,9 mm) sont tout à fait convenables. Les billes alourdies avec les microparticules de verre sont blanchâtres et s'observent très bien dans le plasma. Dans le cas d'un débit nul, quelques billes en suspension ne coulent pas au fond du bioréacteur pour former le lit tassé ce qui suggère une certaine inhomogénéité de l'alourdissement des billes.

Pour conclure, l'alourdissement choisi, 1,25g de microparticules de verre pour 100ml de solution d'alginate, peut être considéré comme pertinent. Pour une même porosité, les débits de fluidisation des billes alourdies dans du plasma sont même légèrement supérieurs à ceux d'une fluidisation de billes vides dans du liquide physiologique.

III.3.3.4 Effet de la bio-encapsulation de sphéroïdes de cellules C3A sur la fluidisation

L'ajout de cellules est aussi susceptible de modifier la masse volumique des billes. Pour évaluer cet effet, des essais de fluidisation ont donc été réalisés à petite échelle dans une solution de Ringer à température ambiante avec des billes contenant 20M de cellules de C3A en sphéroïdes par ml d'alginate (cf. figure 105).

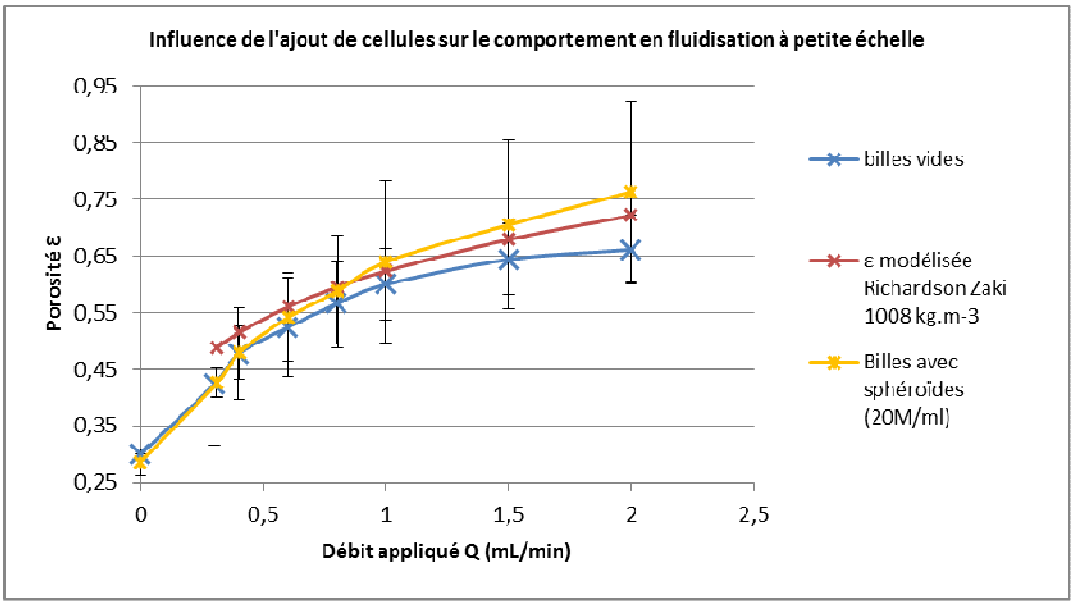


Figure 106: Porosité du lit fluidisé en fonction du débit dans un bioréacteur de petit volume remplit avec des billes vides ou avec des billes contenant des cellules (20M de sphéroïdes de cellules C3A par ml d'alginate) dans du Ringer à température ambiante (n=3)

Les porosités moyennes obtenues avec des billes avec cellules sont très légèrement supérieures à celles obtenues avec des billes vides. Il semble donc que la présence de cellules fasse diminuer la masse volumique des billes (masse volumique proche de 1010 $kg.m^{-3}$ sans cellules et 1008 $kg.m^{-3}$ avec cellules si on utilise le modèle de Richardson et Zaki).

La grande variabilité des résultats provient vraisemblablement de variations lors de la phase d'incorporation des cellules dans l'alginate liquide. Un phénomène de dilution de l'alginate avec le milieu résiduel du culot cellulaire pourrait être responsable de ces variations. Il conviendra donc à l'avenir de mesurer à chaque fois le volume du culot cellulaire ajouté à l'alginate pour confirmer cette hypothèse et pour garantir une meilleure reproductibilité des expériences.

III.3.4 Bilan

Dans cette partie, nous avons pu définir un mode d'utilisation de la colonne MARS avec du plasma dont les caractéristiques correspondent à du plasma pathologique (concentration en protéines, masse volumique). Nous avons déterminé l'alourdissement nécessaire pour les billes d'alginate afin de maintenir une fluidisation optimale au sein du bioréacteur. Cet alourdissement passe par l'inclusion de microparticules de verre de forme sphérique, dans des quantités que nous avons définies. Le comportement du lit fluidisé correspond toujours aux modèles de Richardson et Zaki, et des liens pourront donc être établis avec les travaux précédents de l'équipe.

III.4 PERFUSION DE PLASMA PATHOLOGIQUE ET BIOENCAPSULATION

L'optimisation de la fluidisation requiert d'alourdir les billes avec des microparticules de verre. Cela impose de revisiter le protocole de bio-encapsulation pour inclure ces microparticules dans des billes d'alginate hébergeant des cellules. En effet, il a été vu que l'ajout de microparticules de verre à l'alginate permet d'augmenter la masse volumique des billes et par conséquent d'améliorer les transferts de masse du fait d'une augmentation du débit de perfusion du bioréacteur.

Cependant, l'ajout de ces microparticules a sans doute d'autres impacts. Par exemple, il est possible qu'elles soient un frein à la diffusion de matière au sein de billes ou que leur présence fragilise les billes. Les microparticules sont aussi en compétition spatiale avec les cellules ce qui pourrait perturber leur métabolisme. Pour répondre à ces questions, un certain nombre d'investigations sont proposées ci-après et sont résumées dans la figure 107.

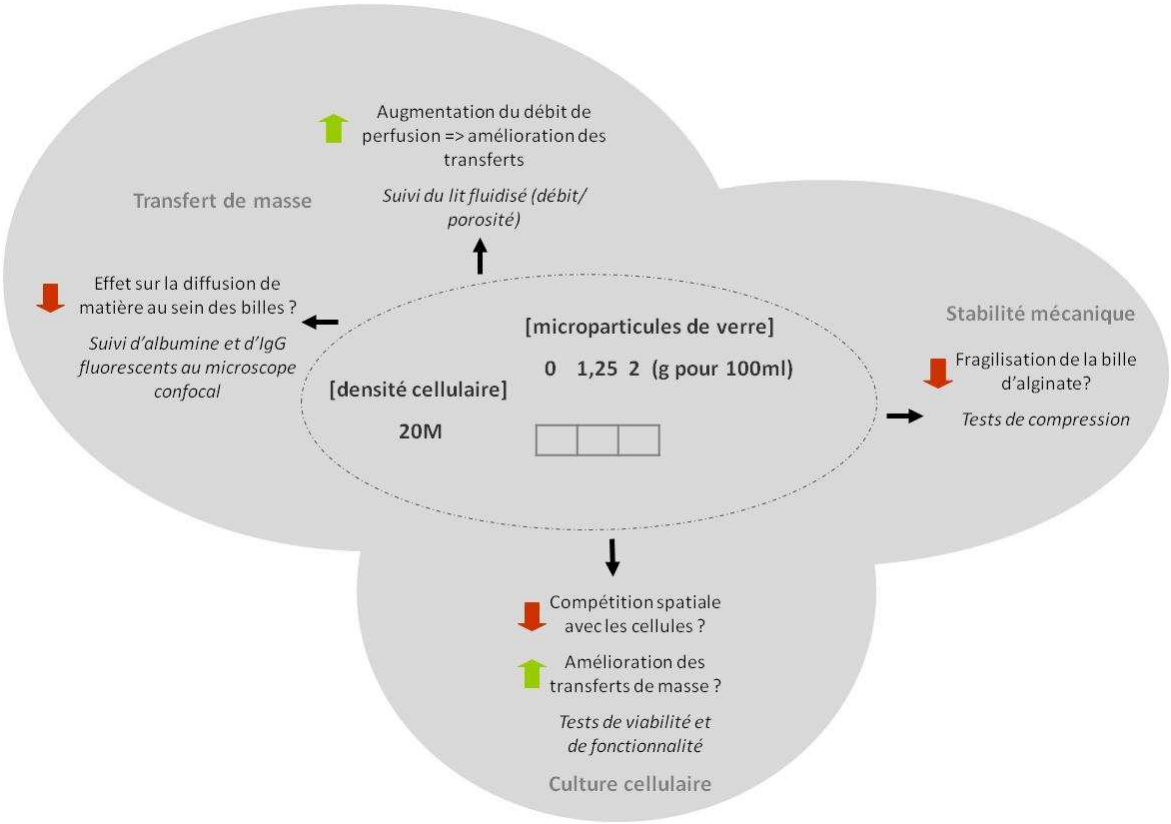


Figure 107: Schéma récapitulatif des problématiques liées à l'ajout de microparticles de verre dans les billes d'alginate et des investigations menées pour mesurer leurs impacts

III.4.1 Impact sur la viabilité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés

Les cellules C3A ont été encapsulées dans les billes d'alginate avec une densité de 20M de cellules / ml d'alginate, ce qui correspond à une forte concentration, en présence ou en absence de microparticules de verre (Fig. 108). Les marquages réalisés montrent de façon qualitative que la viabilité cellulaire post-encapsulation est très bonne, quelle que soit la concentration de microparticules de verre ajoutée aux billes d'alginate. Ce résultat est important car les expériences précédentes au laboratoire ont montré que la phase d'encapsulation, générant de nombreux stress mécaniques, est souvent pénalisante pour la viabilité cellulaire.

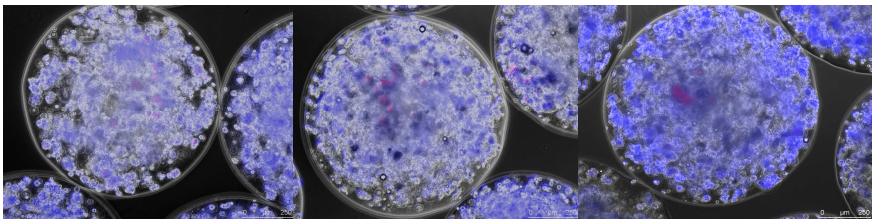


Figure 108: Viabilité des cellules C3A après encapsulation (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). De gauche à droite : Ajout de 0, 1,25 et 2g de microparticules de verre pour 100ml d'alginate

Les trois conditions d'alourdissement ont été mises en culture dans des bioréacteurs à échelle réduite sous des débits permettant d'obtenir une même porosité du lit ($\varepsilon = 0,6$), dans du SVF dilué au demi dans du liquide physiologique. Après 8 h de fluidisation en incubateur (Fig. 109), les billes sont extraites des bioréacteurs et subissent les mêmes marquages. De façon qualitative, la viabilité semble maintenue après ces 8 h de culture en conditions dynamiques (Fig. 110).

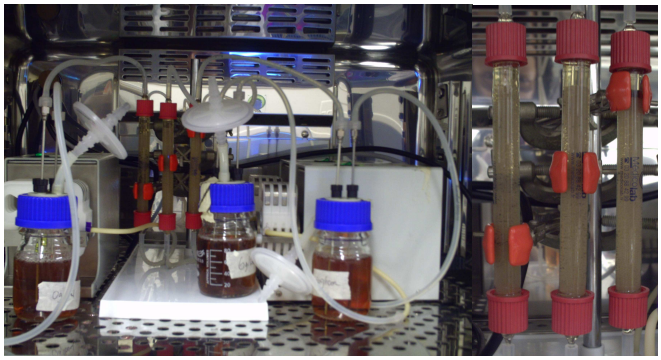


Figure 109: Expérience de fluidisation : 3 conditions ont été testées (01,25 et 2g de microparticules de verre pour 100ml d'alginate) pour une même porosité de lit (0,6)

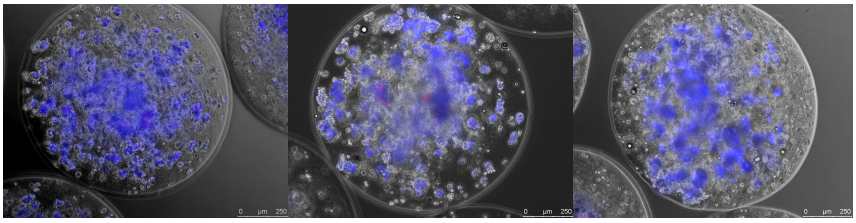


Figure 110: Viabilité des cellules C3A après fluidisation (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). De gauche à droite : Ajout de 0, 1,25 et 2g de microparticules de verre pour 100ml d'alginate

III.4.2 Impact sur la fonctionnalité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés

Des prélèvements de surnageant sont réalisés pour juger de l'impact des microparticules sur la fonctionnalité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés. Les résultats démontrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les trois conditions testées (cf. figure 111), en ce qui concerne les activités biologiques de référence des hépatocytes (synthèse d'albumine, production d'urée, consommation de glucose).

La présence de microbilles de verre dans les billes d'alginate ne semble donc pas impacter la viabilité ou les fonctions biologiques des cellules C3A encapsulées.

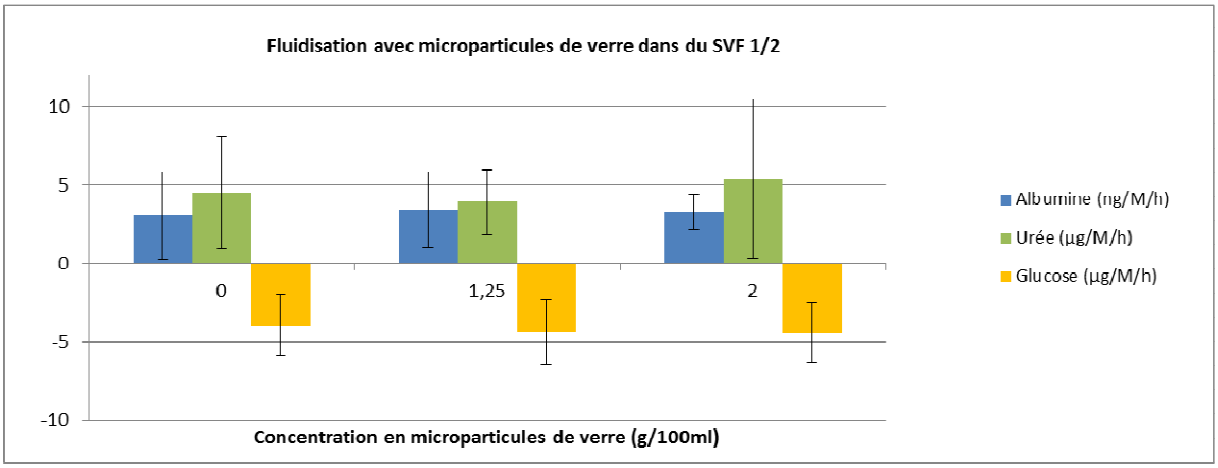


Figure 111: Résultats de consommation de glucose et de production d'albumine et d'urée de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés en fonction de la concentration de microparticules de verre dans les billes (n=3)

III.4.3 Impact sur les propriétés diffusives des billes d'alginate

Les propriétés diffusives des billes ont été évaluées par des essais de perméabilité réalisés par suivi de fluorescence au microscope confocal. Une solution contenant de l'albumine ou des IgG fluorescents (cf. II.1.4.2) ont été mis en contact avec des billes, sans cellules, alourdies ou non de microparticules (cf. figure 112 et 113).

L'albumine pénètre bien dans les billes (avec ou sans microparticules), dont le seuil de coupure est censé être supérieur à la masse molaire de cette protéine (69 kDa). Après rinçage, on observe qu'il n'y a plus trace d'albumine fluorescente à l'intérieur des billes, ce qui indique que cette protéine est totalement sortie des billes au bout d'une heure. Ce résultat conforte les observations et mesures de relargage d'albumine synthétisée par les hépatocytes.

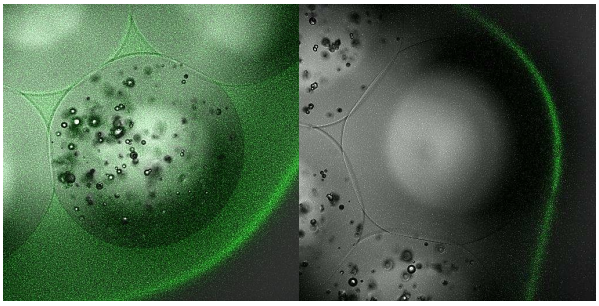


Figure 112: De gauche à droite : Billes d'alginate dans une solution d'albumine fluorescente et une heure après lavage (microscopie confocale)

Concernant les IgG, la structure poreuse de l'alginate (en présence ou en absence de microparticules) est censée former une barrière à leur pénétration dans les billes. Effectivement, les IgG ne semblent pas pouvoir entrer à l'intérieur des billes même après 15h d'incubation. Le surnageant autour des billes joue un rôle important concernant la perméabilité des billes d'alginate du fait des interactions possibles entre l'alginate et des protéines ou d'autres constituants du milieu comme les ions monovalents ou divalents chargés positivement. Des essais dans du SVF ont été réalisés pour se rapprocher des conditions réelles de traitement. L'immunoprotection est aussi observée dans ces conditions, puisque les IgG ne peuvent pas pénétrer dans les billes et entourent la surface de celles-ci (cf. figure 114).

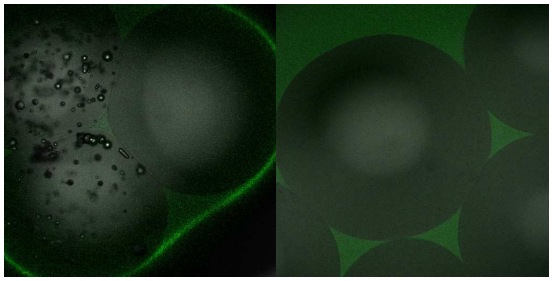


Figure 113: A gauche : Lot de billes d'alginate (avec sans microparticules de verre) dans une solution d'IgG fluorescents. A droite : Billes d'alginate (sans microparticules de verre) dans une solution de SVF contenant des IgG fluorescents

Une analyse d'images à l'aide du logiciel ImageJ montre une diminution très nette de la fluorescence dans la bille ce qui indique que les IgG ne sont pas présent à l'intérieur de celle-ci (cf. figure 35).

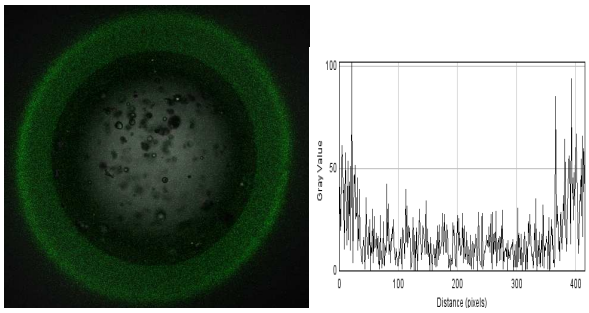


Figure 114: A gauche : Bille d'alginate isolée (avec microparticules de verre) dans une solution d'IgG fluorescents. A droite : Profil de l'intensité de fluorescence de cette bille isolée (Analyse d'images avec ImageJ)

III.4.4 Impact sur les propriétés mécaniques des billes d'alginate

Dans des travaux précédents [57] [58], le laboratoire avait étudié l'impact de différentes conditions de culture et de différents surnageant sur la tenue mécanique des billes d'alginate. En effet, il est important que l'intégrité mécanique des billes soit maintenue pendant toute la phase d'utilisation. Avec l'inclusion de microparticules de verre très rigides, il est légitime de s'interroger sur leur impact sur les propriétés mécaniques des billes fabriquées.

Des tests de compression ont donc été réalisés sur des billes sans cellules dans du liquide de Ringer (cf. figure 115). Trois conditions ont été testées: 0, 1,25 et 2g de microparticule pour 100ml d'alginate. Dans chaque cas, quinze billes ont été analysées.

L'enregistrement des forces permettant d'obtenir un écrasement donné (diminution du diamètre apparent) traduit un comportement de type élastique de référence pour les billes sans microparticules de verre (Fig. 115). Ces courbes sont similaires à celles obtenues par B. David [58], et permettent de calculer le module de cisaillement, comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les fluctuations du signal de force enregistrées en présence de microparticules traduisent une perturbation du comportement élastique, notamment dans le domaine des grandes déformations.

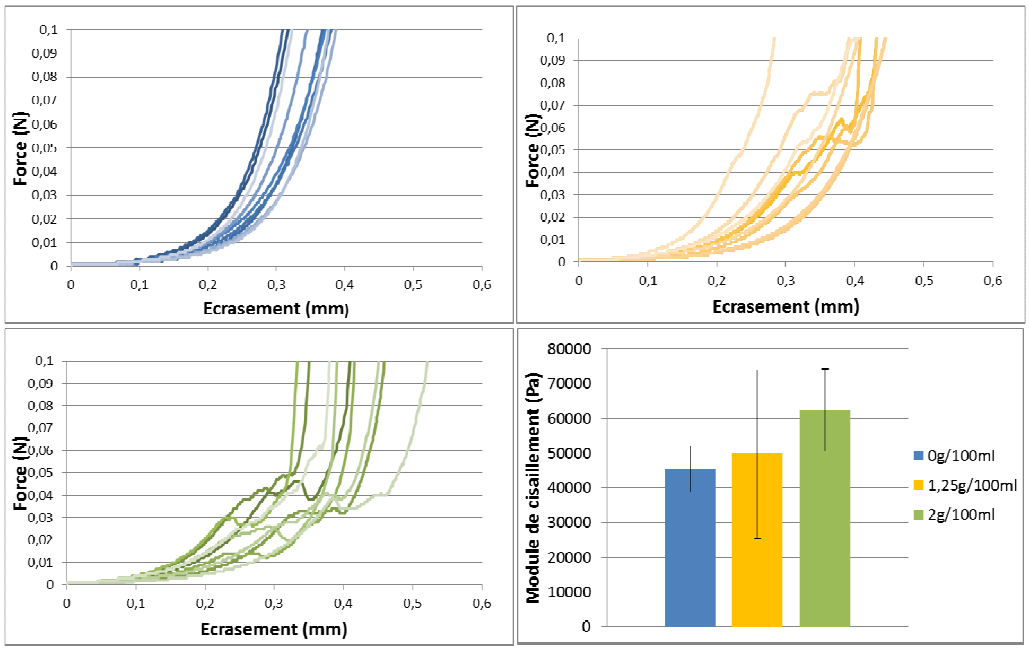


Figure 115: Résultats des tests de compressions (machine MTS) des billes d'alginate sans cellules alourdies ou non avec des microparticules de verre dans du liquide de Ringer (n=3 avec cinq billes testées en répliquât soit quinze billes testées par conditions)

Plus la concentration en microparticules est élevée plus ces perturbations sont nombreuses et apparaissent à de faibles valeurs de force. Elles témoignent de l'inhomogénéité (évidente) des billes d'alginate hébergeant des microparticules. Les modules de cisaillement des trois conditions, calculés pour de faibles déformations, sont tout de même très proches et du même ordre de grandeur que ceux calculés lors des études précédentes.

Une autre campagne d'essais a été réalisée avant et après environ 8h de fluidisation avec des billes contenants des cellules (20M/ml d'alginate) (cf. figure 116).

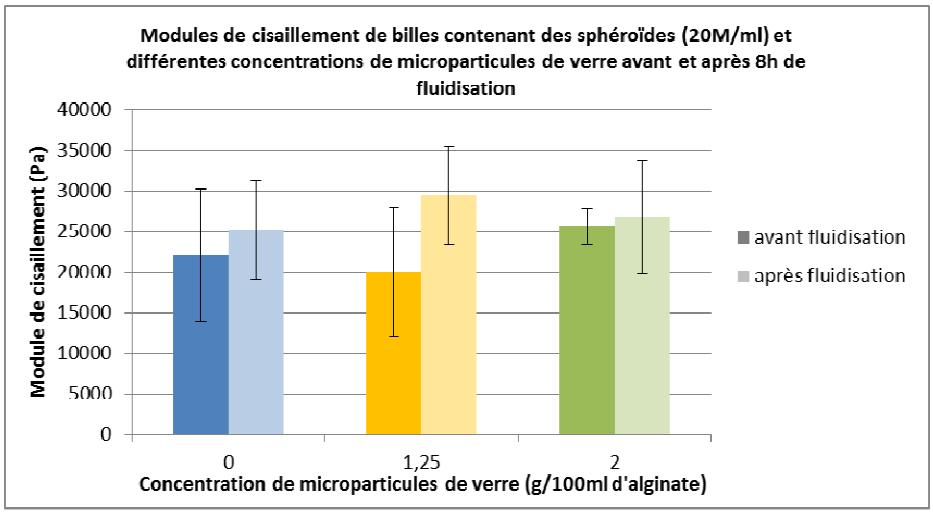


Figure 116: Résultats des tests de compressions (machine BOSE) des billes d'alginate avec cellules, alourdies ou non avec des microparticules de verre et avant et après 8h de fluidisation dans du SVF dilué de moitié dans du liquide physiologique (n=3 avec cinq billes testées en répliquât soit quinze billes testées par conditions)

Ces essais n'ont pas été réalisés sur la même machine de compression (BOSE) ni dans le même milieu que les essais précédents sans cellules. Cependant, en comparant les modules de cisaillement avec ou sans cellules, il semble que la présence de cellules diminue la résistance des billes. Les résultats obtenus par B. David [58], vont aussi dans ce sens. De plus, une tendance à l'amélioration des propriétés mécaniques s'avère être visible au cours de la culture des cellules au sein des billes. Cela pourrait être dû à la production de matrice extracellulaire. Il est néanmoins délicat de tirer des conclusions du fait de la variabilité inter-billes et de la taille des barres d'erreurs.

III.4.5 Bilan

Pour conclure cette partie, on peut donc considérer que l'alourdissement des billes avec des microparticules de verre, nécessaire au bon fonctionnement du bioréacteur à lit fluidisé, n'a pas d'impact majeur sur les propriétés mécaniques et diffusives des billes, ni sur le comportement biologique des cellules encapsulées. Ces résultats sont donc tout à fait encourageants pour la mise en œuvre de ce procédé à grande échelle.

III.5 PASSAGE A L'ECHELLE HUMAINE ET BIOENCAPSULATION

Dans cette partie, les études ont été guidées par la nécessité d'obtenir d'une quantité suffisante de cellules hépatiques encapsulées.

La besoin de disposer d'une masse importante de billes pour le passage à l'échelle humaine amène un certain nombre de questionnements en rapport avec la bio encapsulation, tels que la problématique de la stérilisation de grands volumes d'alginate et l'utilisation d'un système adapté pour la production de billes à grande échelle. Enfin, la stratégie de culture cellulaire à adopter pour la production en masse de cellules fonctionnelles a été étudiée de façon préliminaire.

III.5.1 Impact d'une stérilisation à l'autoclave par rapport à une stérilisation par filtration sur des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés

Un des points critiques concernant le passage à l'échelle humaine, et donc la production en masse de billes, est la stérilisation de l'alginate. En effet ce matériau est difficilement stérilisable du fait de la grande fragilité de ses chaînes. Il peut être acheté stérile auprès de sociétés telles que FMC BioPolymer, mais le coût est prohibitif dans le cas d'une production en masse de billes. Deux méthodes de stérilisation ont donc été testées et comparées au laboratoire.

La filtration frontale sur membrane microporeuse est la méthode classique utilisée pour stériliser de petits volumes d'alginate. Cette technique manuelle est contraignante car l'alginate est très visqueux (de l'ordre de 200 à 300 mPa.s à température ambiante). Une pression très grande doit être exercée et un colmatage rapide des pores amène à l'utilisation de nombreux filtres. Des méthodes de filtration à grande échelle ont été testées sans succès (utilisation de pompe à vide, filtration tangentielle avec un filtre de plasmaphérèse…).

L'autoclavage a donc été envisagé comme solution pour stériliser plus facilement de très grands volumes d'alginate. Avec cette méthode, connue pour briser les chaines de l'alginate, il convient donc de réaliser un certain nombre de contrôles avant validation ou rejet. Les billes ont notamment été fabriquées à partir d'un alginate légèrement plus concentré (1,7g /100ml au lieu des 1,5 g/100ml pour une stérilisation par filtration).

III.5.1.1 Viabilité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés

Des sphéroïdes de cellules C3 ont été encapsulés dans un alginate stérilisé par filtration ou par autoclavage. Une culture en boite de Petri sous conditions agitées a été réalisée pendant 3 jours dans du milieu de culture MEM (cf. figure 117).

Figure 117: Culture dynamique en agitateur orbital de billes contenant des sphéroïdes de cellules C3A faites avec de l'alginate stérilisé par filtration ou autoclavage

Sous microscope à épifluorescence avec les marquages Hoechst et IP, une bonne viabilité des cellules est observée quelle que soit la stérilisation effectuée (cf. figure 118), bien que les billes fabriquées avec l'alginate autoclavé soient plus déformées.

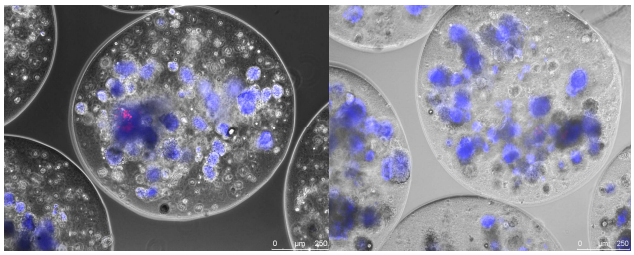


Figure 118: Viabilité des cellules C3A après culture dynamique (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). A gauche : Stérilisation par filtration. A droite : Stérilisation par autoclavage.

III.5.1.2 Fonctionnalité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés

Concernant la fonctionnalité des cellules, les productions et consommations semblent équivalentes malgré une plus faible production d'albumine pour les cellules encapsulées dans un alginate stérilisé par autoclave (non significative) (cf. figure 119).

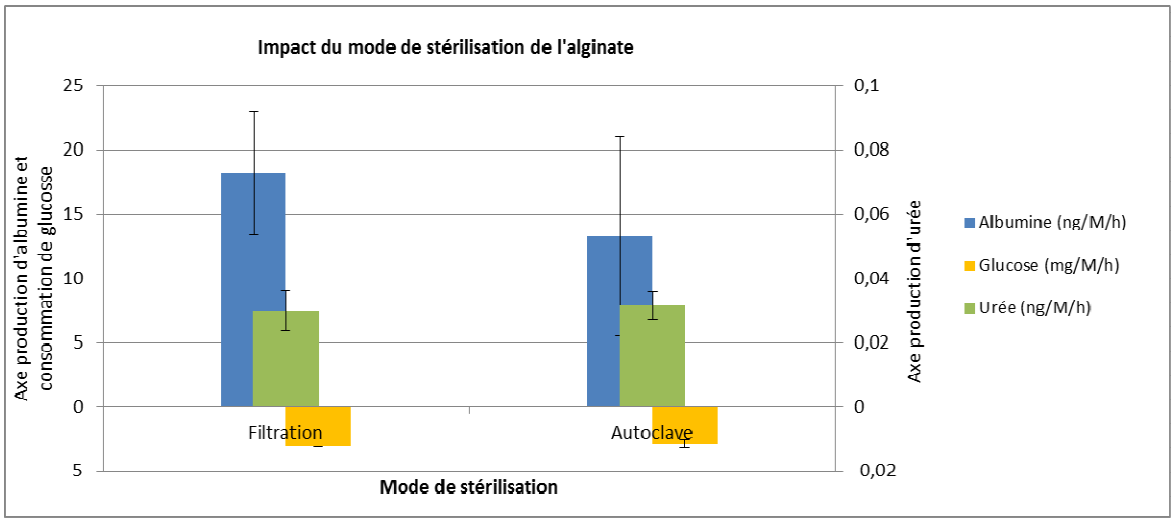


Figure 119: Résultats de consommation de glucose et de production d'albumine et d'urée des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés en fonction du mode de stérilisation de l'alginate (n=3)

III.5.1.3 Propriétés diffusives et mécaniques des billes d'alginate stérile

Par ailleurs, les propriétés diffusives ont été analysées avec des billes sans cellules. Des billes autoclavées et des billes filtrées ont été mélangées dans une solution d'albumine fluorescente ou dans une solution d'IgG fluorescents. Aucune différence n'est observée entre les deux populations de billes présentes dans les échantillons (cf. figure 120). Les billes d'alginate, qu'elles soient filtrées ou autoclavées, possèdent qualitativement la même perméabilité à l'albumine et la même immunoprotection face aux IgG. La perméabilité des billes ne semblent donc pas être impactée par la technique de stérilisation.

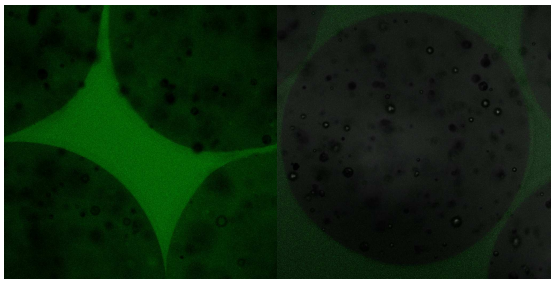


Figure 120: A gauche : Lot de billes d'alginate (stérilisé par filtration et par autoclavage) dans une solution d'albumine fluorescente. A droite : lot de billes d'alginate (stérilisé par filtration et par autoclavage) dans une solution d'IgG fluorescents

Pour évaluer la résistance mécanique des billes, les tests de compressions n'ont pas été réalisés. En effet, il était clair, par l'observation au microscope, qu'un grand nombre de billes fabriquées avec de l'alginate autoclavé étaient déformées signe d'une plus faible résistance mécanique (cf. figure 121). La viscosité de l'alginate liquide n'a cependant pas été mesurée ce qui est regrettable.

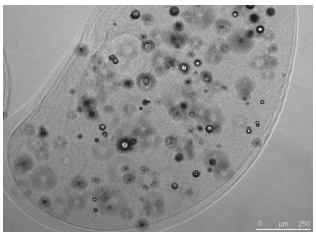


Figure 121: Bille déformée produite lors d'une fabrication utilisant de l'alginate autoclavé

En conclusion, bien que la stérilisation par autoclave permette apriori d'avoir des cellules aussi fonctionnelles et des transferts de masse du même ordre que lors d'une stérilisation par filtration, la fragilité de certaines billes produites par cette méthode la rend inexploitable en l'état pour notre application. Une optimisation de la technique de production des billes à l'aide d'un autre dispositif de fabrication, d'un ajustement de la concentration de la solution d'alginate ou d'un ajout de revêtement (par exemple de poly-L-lysine ou de chitosan) pourrait permettre d'utiliser l'autoclavage comme mode de stérilisation. Une augmentation trop importante de la concentration de la solution d'alginate ou un ajout de revêtement auraient cependant l'inconvénient de diminuer le transfert de masse. Ces alternatives n'ont pas pu être explorées dans le cadre de ce travail.

III.5.2 Fabrication de billes vides et alourdies avec l'appareil Nisco

Pour une production à grande échelle, il faut aussi d'envisager d'abandonner la technique d'extrusion par flux d'air coaxial développée au laboratoire. Dans cette perspective, le laboratoire a acquis un appareil commercial (Nisco), qui fonctionne le principe de « vibrating noozle » pour former les goutte d'alginate, et permet une grande production de billes dans des conditions d'utilisation simplifiées (cf. II.1.2.2). Il présente également l'avantage d'être autoclavable, ce qui permettra de maintenir la stérilité dans cette phase du procédé d'encapsulation. Il a été utilisé avec succès pour produire des billes d'alginate vides. Les paramètres utilisés ont alors été appliqués pour produire des billes avec des microparticules de verre. Les billes alors obtenues sont très grosses et complètement déformées (cf. figure 122).

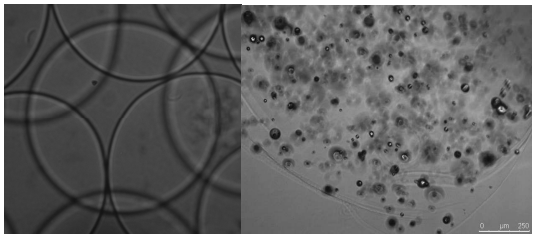


Figure 122: A gauche: Billes d'alginate vides produites avec l'appareil Nisco. A droite: Billes d'alginate, avec un alourdissement à 1,25g/ 100ml de microparticules de verre, produites avec l'appareil Nisco. (Fréquence 200Hz, Amplitude 100 %, Débit d'alginate 10ml /min)

Sachant que ces étapes de mise a point sont toujours longues, et dépendent des caractéristiques de l'alginate sous forme liquide (viscosité) ainsi que des paramètres physiques menant à la formation de gouttes à la sortie de la buse (débit d'alginate, fréquence de vibration), une campagne expérimentale spécifique devra être envisagée pour trouver des paramètres optimaux pour la production en quantité importante de billes d'alginate alourdies de microparticules de verre.

III.5.3 Obtention d'une masse cellulaire suffisante pour les essais à grande échelle

En parallèle des problématiques concernant la fabrication de billes stériles à grande échelle, se pose la question de la production en masse de billes hébergeant des cellules et donc de l'obtention de ces cellules. Dans le cadre du projet SUPPLIVER, il a été constaté, au cours des 3 ans, un manque de disponibilité des cellules primaires humaines, même cryopréservées. Les cellules C3A avaient été choisies comme substitut pour anticiper les développements liées au passage d'échelle, cependant du fait de la rareté des cellules primaires et de l'avancement du projet, elles redeviennent ou plutôt demeurent une source potentielle de cellules pour des applications de traitement lors d'essais précliniques ou même cliniques. Pour mémoire, elles sont employées (et autorisées dans certains pays) pour les essais cliniques du système ELAD. De ce fait et afin de mettre en place des fluidisations à grande échelle avec des cellules, des essais préliminaires ont été faits avec des cellules C3A dans du milieu de culture.

Le but de ces essais était de comparer deux méthodes de production de billes contenant une masse cellulaire suffisante: une prolifération de cellules isolées à l'intérieur des billes et une encapsulation de sphéroïdes issus d'une culture dynamique en boites de Petri (cf. figure 123).

La méthode développée au laboratoire (encapsulation de sphéroïdes préalablement formés) est ainsi comparée à la technique de prolifération in situ déjà largement étudiée par l'équipe de Selden [64]. Récemment, une équipe a mis à profit cette méthode de prolifération in situ dans les billes pour cultiver des cellules pluripotentes induites de souris [104].

Les tests ont été réalisés à petite échelle mais les contraintes, liées à l'application des deux techniques en condition réelle, ont été respectées. Par exemple, la production de sphéroïdes en boites de Petri nécessite beaucoup de matériel et il est difficilement envisageable de pouvoir produire en une seule fois le nombre de billes nécessaire pour une thérapie. Les billes ou sphéroïdes devront surement subir une étape de congélation ou cryopréservation. Dans le cas d'une prolifération de cellules isolées au sein des billes, le passage à l'échelle est plus simple seule une étape de conservation à température ambiante ou à 4°C pourrait être envisagée pour acheminer les cellules au lit du patient. Il faut, en revanche, anticiper le temps nécessaire à la prolifération.

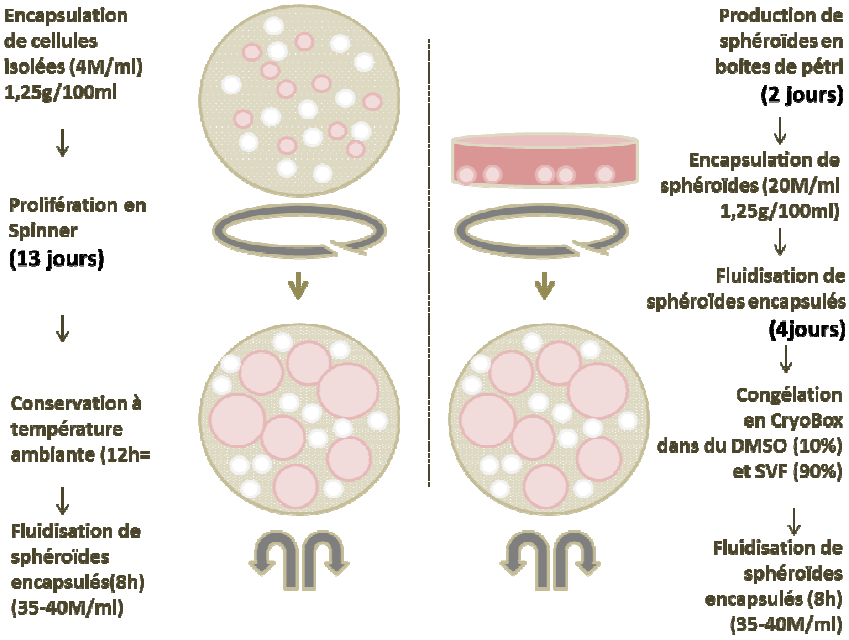


Figure 123: Schéma récapitulatif des deux méthodes testées pour la production en masse de billes contenant des cellules C3A

La prolifération des cellules isolées a été réalisée sous agitation en Spinner et non dans des petits bioréacteurs à lit fluidisé car des problèmes d'adhésion aux parois sont survenus. Ce problème a persisté même avec l'ajout d'un revêtement anti-adhérent de Sigmacoate au niveau des parois du bioréacteur. La production de matrice extracellulaire pourrait être à l'origine de ce phénomène.

Pour juger de la capacité des deux techniques à pouvoir produire un bioréacteur à échelle humaine fonctionnel, plusieurs paramètres ont été pris en compte.

La densité cellulaire doit pouvoir être la plus importante possible tout en évitant la sortie de cellules en dehors des billes. Les cellules doivent conserver une bonne viabilité et une bonne fonctionnalité. Enfin, il faut que les billes aient une bonne résistance mécanique.

Il faut noter que les résultats présentés ci-après restent préliminaires, car les essais n'ont pas été répétés.

III.5.3.1 Prolifération et viabilité des cellules C3A encapsulées

Les résultats concernant la prolifération des cellules C3A sont présentés ci-dessous (cf. figure 124).

Deux conditions sont comparées :

- sous une densité initiale de 20M/ml d'alginate, quatre jours de culture sont nécessaires pour doubler la densité cellulaire des sphéroïdes encapsulés.
- pour les cellules isolées encapsulées à une densité initiale de 4M/ml d'alginate, il faut douze jours pour obtenir un facteur de prolifération de 7 à 8.

Dans les deux cas, un nombre important de cellules peut être atteint au sein des billes avant que celles-ci ne soient endommagées par la prolifération (autour des 35 à 40M de cellules par ml d'alginate).

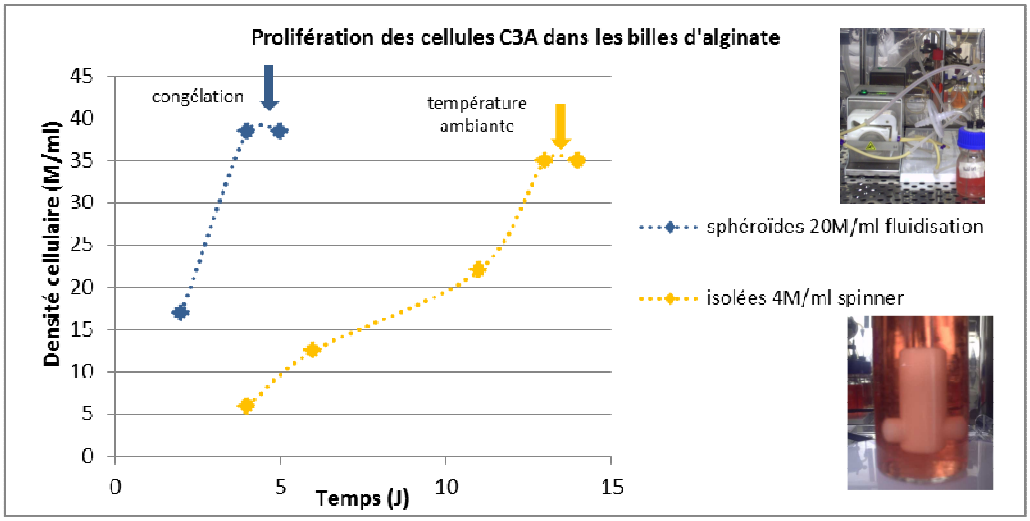


Figure 124: Suivi de la prolifération des cellules C3A au sein des billes d'alginate

Les billes ont été observées au microscope et un marquage de viabilité a été réalisé avant la congélation ou la mise à température ambiante. Une analyse d'images, avec imageJ, a montré que la quantité de fluorescence était similaire aux deux points temps, Jour 4 et Jour 13, confirmant les comptages effectués.

Une observation, de billes contenant des sphéroïdes ayant été cultivés 6 jours en fluidisation, montre que les cellules commencent à s'échapper des billes. On atteint une densité limite surement proche des 45-50M de cellules par ml d'alginate (le comptage n'a pas été réalisé). Les amas cellulaires formés dans les billes pendant la culture en Spinner ne sont pas sphériques mais de forme ovoïde. Ils sont aussi moins homogènes entre eux et leur répartition au sein des billes est moins uniforme (cf. figure 125 et 126).

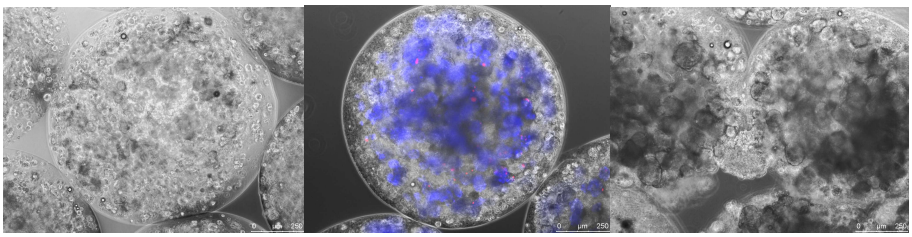


Figure 125: Observation de la prolifération et de la viabilité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés après une culture en fluidisation (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). De gauche à droite : Jour 0, Jour 4 et Jour 6.

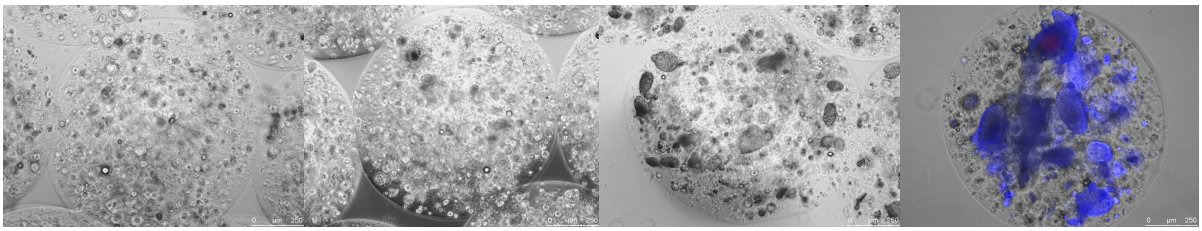


Figure 126: Observation de la prolifération et de la viabilité des cellules C3A isolées encapsulées après une culture en Spinner (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). De gauche à droite : Jour 4, Jour 6, Jour 11 et Jour 13.

Des marquages de viabilité on été effectués après la phase de conservation. La viabilité apparaît être seulement légèrement diminuée par la congélation. La conservation à température ambiante et en statique de 12h ne semble pas avoir d'impact sur la viabilité des cellules (cf. figure 127).

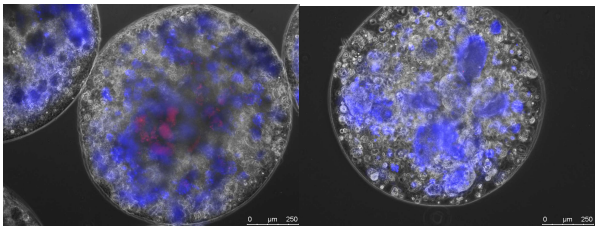


Figure 127 : Viabilité des cellules C3A après conservation (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). A gauche : Viabilité après congélation. A droite : Viabilité après maintien à température ambiante.

III.5.3.2 Fonctionnalité des cellules C3A encapsulées

Pour chaque condition un suivi des performances métaboliques des cellules a été fait (cf. figure 128 et 129). Par ailleurs, la fonctionnalité de cellules isolées dans les billes d'alginate semble optimale lorsque les sphéroïdes sont bien formés (au bout de 13 jours de culture). Ces résultats sont à nuancer car les changements de milieu n'ont pas été faits de manière régulière.

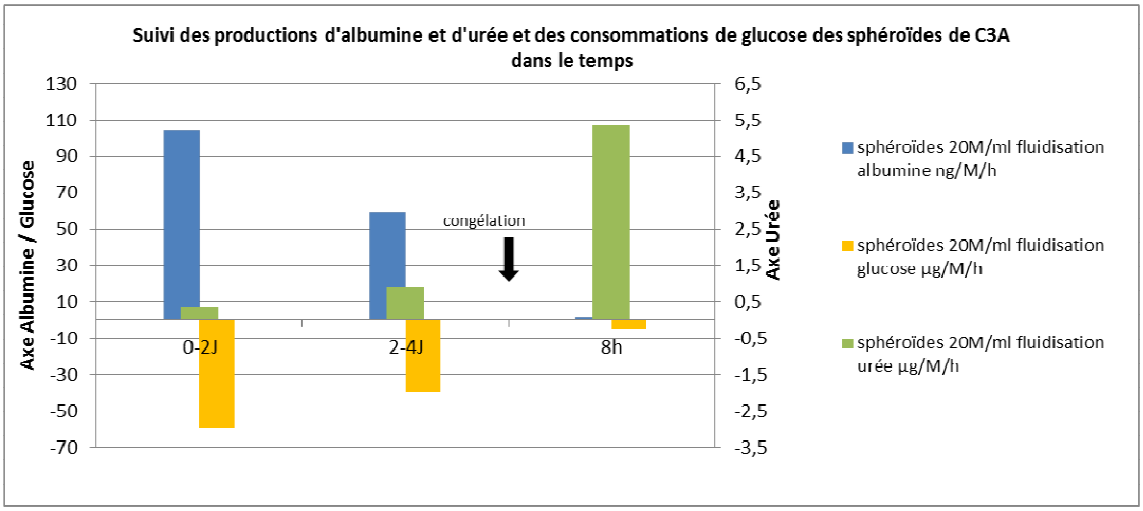


Figure 128: Résultats de consommation de glucose et de production d'albumine et d'urée de sphéroïdes de C3A encapsulés et cultivés en fluidisation pendant 4 jours puis, après congélation, en fluidisation pendant 8h

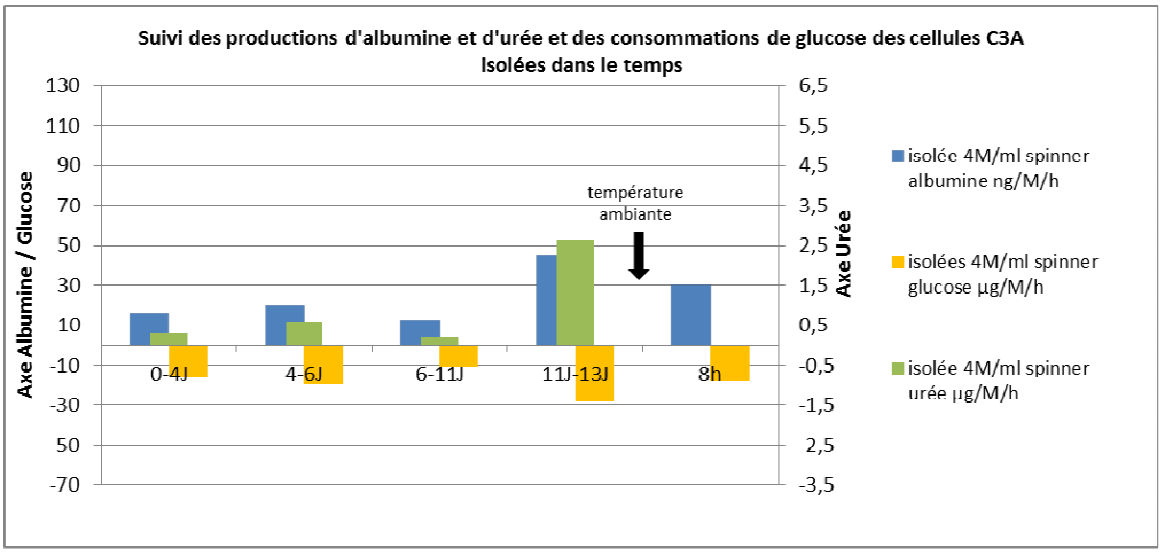


Figure 129: Résultats de consommation de glucose et de production d'albumine et d'urée de cellules isolées C3A encapsulées et cultivées en Spinner pendant 13 jours puis, après 24 heures à température ambiante, en fluidisation pendant 8h

Lorsque l'on compare les conditions l'une par rapport à l'autre, les sphéroïdes formés avant encapsulation semblent plus fonctionnels que ceux qui sont formés à l'intérieur des billes. En effet, avant la phase de conservation, leur production d'albumine est très supérieure à celle des amas formés in situ. Cependant, on observe que leur activité métabolique diminue rapidement. Ces résultats sont à relativiser car les cellules ne sont pas cultivées dans les mêmes conditions (fluidisation ou agitation en Spinner).

Le mode de conservation a un impact évidant sur la culture cellulaire. La congélation diminue très fortement les capacités de synthèse d'albumine des sphéroïdes encapsulés. La synthèse d'urée est par contre particulièrement augmentée dans ce cas. La conservation à température ambiante et le passage à une culture en fluidisation semble diminuer les capacités métaboliques des cellules notamment pour la production d'urée (cf. figure 130 à 132). Comme indiqué précédemment, ces essais seront à répéter avant de tirer des conclusions définitives.

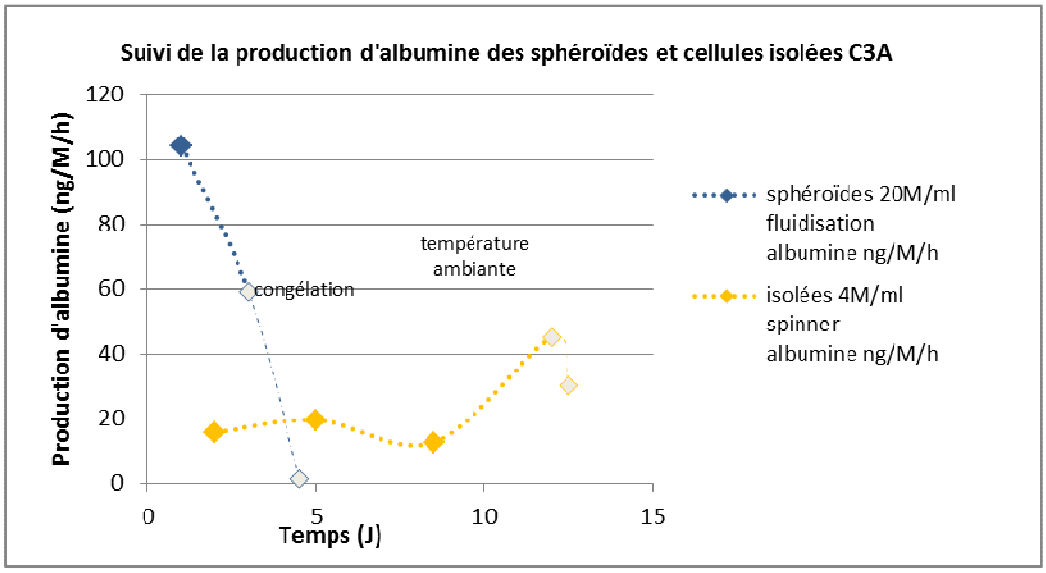


Figure 130: Comparaison de la production d'albumine au cours du temps de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés par rapport aux cellules C3A isolées encapsulées

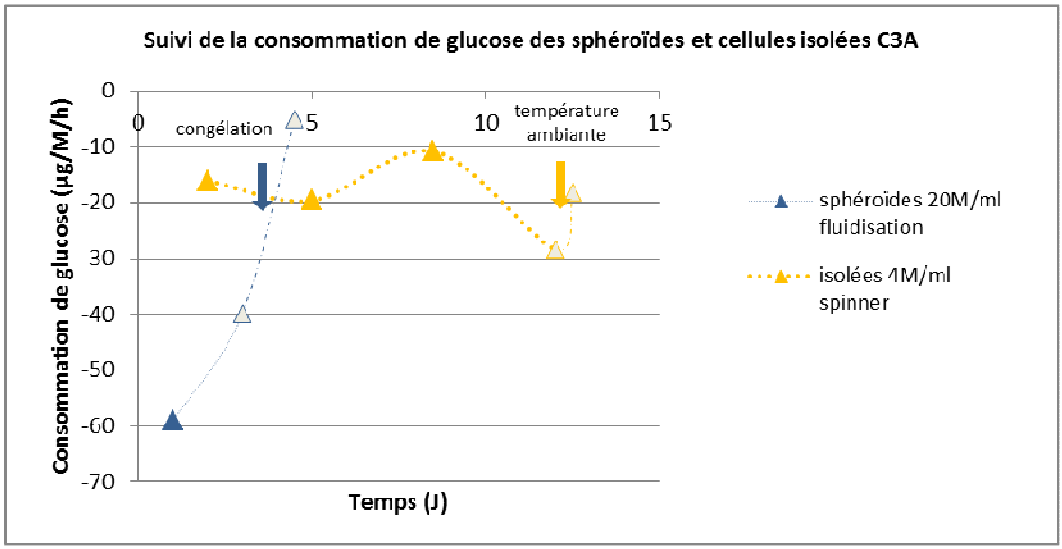


Figure 131: Comparaison de la consommation de glucose au cours du temps de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés par rapport aux cellules C3A isolées encapsulées

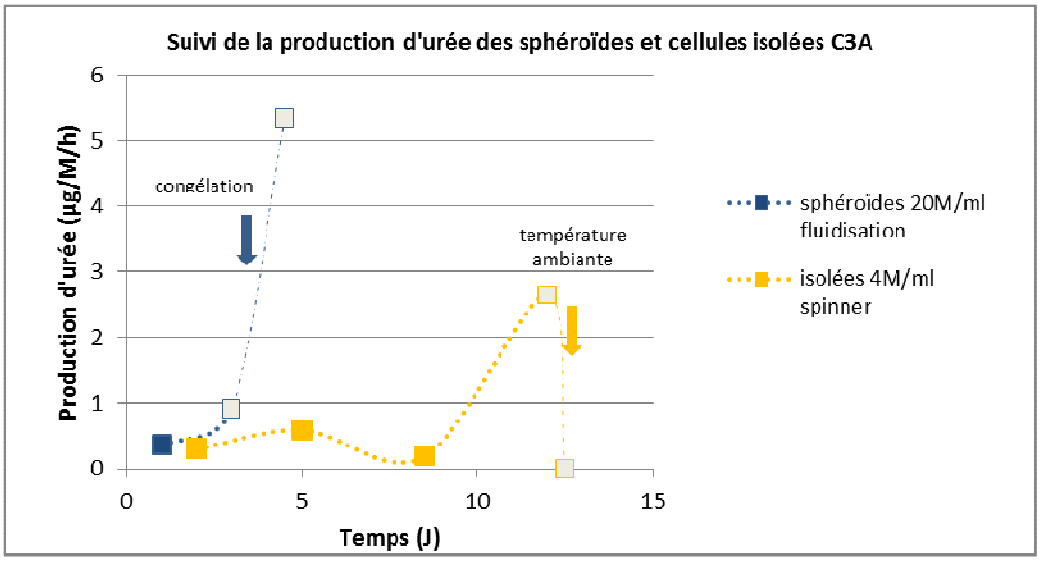


Figure 132: Comparaison de la production d'urée au cours du temps de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés par rapport aux cellules C3A isolées encapsulées

III.5.3.3 Propriétés mécaniques des billes d'alginate

Des tests de compressions ont été faits sur les deux conditions avant la phase de conservation (avec une densité cellulaire proche des 35M de cellules / ml d'alginate), après la phase de conservation (congélation ou mise à température ambiante) et après la culture finale de 8h en fluidisation. Il faut noter que certaines billes ont été endommagées de manière visible par la congélation (surface ondulée) (cf. figure 133). Une fragilisation mécanique peut être suspectée.

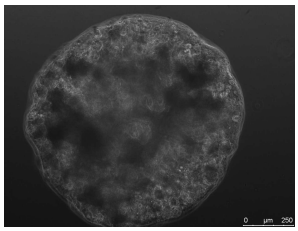


Figure 133: Observation des billes d'alginate après congélation

Il semblerait que la culture augmente la résistance mécanique des billes (cf. III.4.4). En effet, après 13 jours de culture les billes sont plus résistantes qu'après 4 jours pour une densité cellulaire très proche. Cela pourrait être dû à la production de matrice. Les cellules sont aussi réparties dans les billes de manières différentes dans les deux conditions. La conservation par congélation semble diminuer le module de cisaillement des billes. Après fluidisation le comportement mécanique des deux conditions est finalement très proche (cf. figure 134).

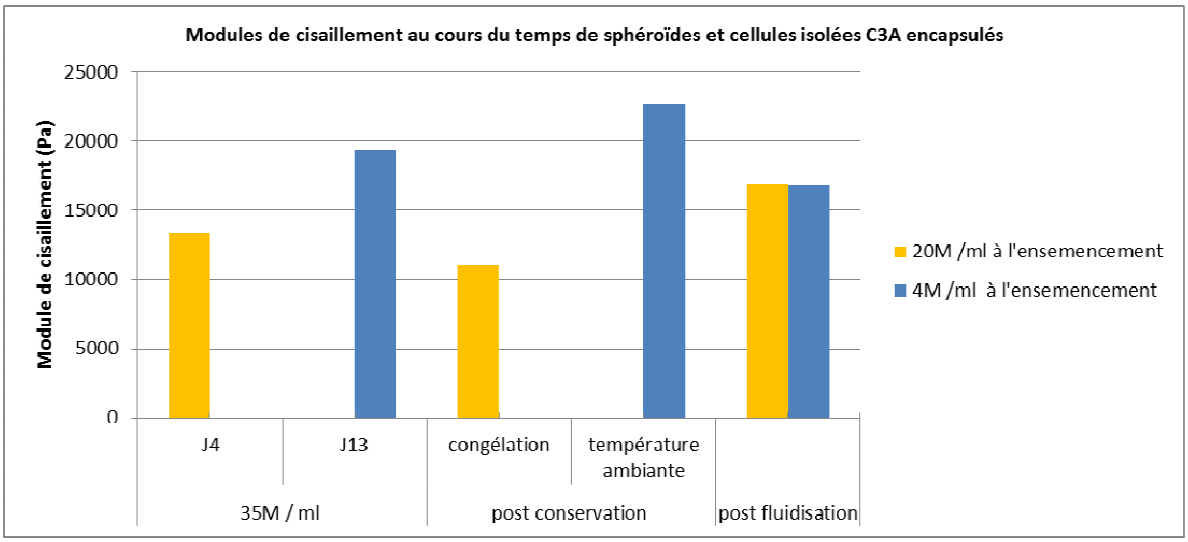


Figure 134: Résultats des tests de compressions comparant la culture de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés par rapport à celle de cellules C3A isolées encapsulées

III.5.4 Bilan

Dans cette partie, nous avons abordé un certain nombre de problématiques liées au futur déploiement de la microencapsulation des cellules pour une production en masse. En ce qui concerne la stérilisation de l'alginate, il semble que l'autoclavage puisse être envisagé si on travaille en parallèle sur le renforcement mécanique des billes.

Plusieurs pistes potentielles sont proposées : inclusion d'autres composants pour stabiliser la structure, prolifération pendant plusieurs jours des cellules qui produisent leur propre matrice, … De même, l'usage du dispositif Nisco, qui permet une production à grande échelle de billes, nécessite la mise en place d'une étude paramétrique. Si des solutions sont proposées pour stabiliser l'alginate gélifié, il est possible qu'elles améliorent aussi la qualité des billes produites par ce dispositif.

En ce qui concerne la meilleure méthode pour encapsuler un grand nombre de cellules fonctionnelles, l'approche à privilégier dépendra certainement du futur type cellulaire choisi : si les cellules sont hautement proliératives, il parait préférable de laisser la prolifération s'effectuer dans les billes, donc post-encapsulation. Si elles ne le sont pas, l'encapsulation sous forme de sphéroïdes préalablement formés est à privilégier, car ceux-ci sont immédiatement très fonctionnels. Il reste à mettre au point et valider les méthodes de cryopréservation et de décongélation si elles s'avèrent nécessaires.

III.6 CONCLUSION

Nous avons abordé ce chapitre en analysant la problématique du passage de l'*in vitro* à l'*in vivo* (from bench to bed) sous l'angle de la conception du bioréacteur à lit fluidisé. Dans cette démarche translationnelle, le pragmatisme nous a fait choisir une cartouche (vide) du système MARS, qui présentait l'avantage d'être déjà produite pour un usage clinique. Cette cartouche, qui a été équipée d'un répartiteur, assure une très bonne fluidisation des billes d'alginate. Son volume de 250ml permet d'envisager une adaptabilité du système puisque, selon les besoins, un nombre variable de cartouches peut être inclus au circuit extracorporel. Le nombre de cellules à cultiver pourra être ajusté en fonction du patient à traiter.

Nous nous sommes assurés que le comportement du lit fluidisé de billes dans du plasma pouvait être comparé, par analyse adimensionnelle pour le changement d'échelle, à celui déjà décrit et analysé pour les petits bioréacteurs avec du sérum physiologique et du milieu de culture. Cette approche a imposé la mise en œuvre d'un alourdissement des billes par des microparticules de verre afin de tenir compte des différences de masse volumique qui guident le comportement du lit fluidisé. Il a alors fallu étudier si la présence de microparticules de verre était délétère pour la bio-encapsulation. Aucun impact négatif n'a été observé quant à la viabilité et à la fonctionnalité des sphéroïdes de C3A encapsulés et cultivés en fluidisation à petite échelle. De plus, les microparticules ne semblent avoir d'effets ni sur les propriétés diffusives ni sur la stabilité mécanique des billes pour de faibles déformations. Ces résultats ont été présentés lors du congrès ESAO à Rome en septembre 2014.

Concernant le passage à l'échelle humaine, la problématique de la production en masse de billes d'alginate vides a été investiguée. Une amélioration du protocole de production des billes avec l'appareil Nisco doit impérativement être réalisée pour la poursuite d'essais de grande ampleur. En effet, l'ajout de microparticules de verre complexifie la production des billes à grande échelle. La stérilisation par filtration étant fastidieuse et peu adaptée aux grands volumes, l'autoclavage de l'alginate a été testé. Les cellules se comportent de manière semblable, en termes de viabilité et de fonctionnalité, dans des billes faites avec un alginate stérilisé par autoclave ou par filtration. Les billes d'alginate autoclavé sont cependant très difficiles à former du fait d'une altération des propriétés rhéologiques de l'alginate. Enfin, des essais préliminaires concernant la production en grande quantité de billes contenant des cellules C3A fonctionnelles ont été réalisés. La production de sphéroïdes par agitation orbitale en boites de Petri sigmacoatées s'avère être prometteuse. Il convient cependant de l'associer à une méthode de cryopréservation permettant le maintien des capacités métaboliques des cellules. L'ensemble de ce travail fixe les bases pour l'usage des cellules encapsulées et du/des bioréacteurs dans une circulation extracorporelle complète. Celle-ci est étudiée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV: **CONCEPTION ET DESCRIPTION DE LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE**

IV.1 CAHIER DES CHARGES POUR LA CONCEPTION DE LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE

Le bioréacteur à lit fluidisé est destiné à être perfusé par le plasma pathologique du patient (cf. I.5.3.2.2). Pour développer la circulation extracorporelle SUPPLIVER, le choix a donc été fait de se rapprocher d'un set classique Prismaflex de plasmaphérèse. Ce set doit cependant permettre la réalisation d'une boucle fermée sur le circuit plasmatique secondaire, alors que le set classique prévoit une sortie (pour l'élimination du plasma) et une arrivée de fluide de substitution. Les même composants sont utilisés (lignes, raccords, piège à bulles, capteurs …) et positionnés d'une manière assez similaire à celle d'un circuit de plasmaphérèse standard pour assurer la circulation des fluides et la sécurité du patient. Des modifications ont été apportées à ce circuit de plasmaphérèse dans le but de répondre au cahier des charges de la thérapie SUPPLIVER. Ce cahier des charges comporte trois points essentiels : intégrer le bioréacteur au circuit extracorporel, assurer une fonctionnalité optimale des cellules (maintien d'une température 37°C au sein des bioréacteurs, oxygénation du circuit secondaire…) et assurer la sécurité du patient vis-à-vis du risque biologique (cf. figure 135).

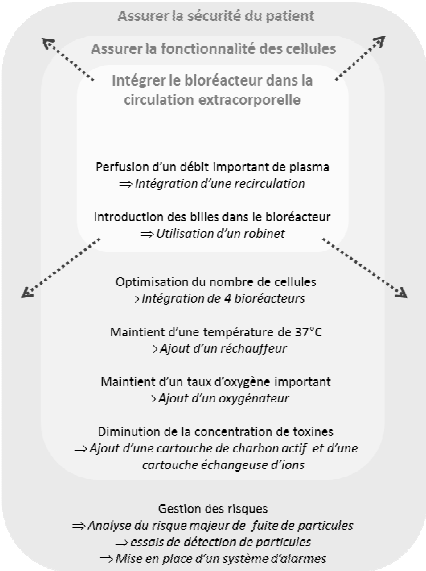


Figure 135: Schéma récapitulatif du cahier des charges et des solutions envisagées

IV.1.1 Intégration du bioréacteur à lit fluidisé au circuit extracorporel

Le choix a été fait d'intégrer au circuit une cartouche vide du système MARS comme bioréacteur (cf. III.2.1). Ces cartouches ont en effet l'avantage de pouvoir être facilement incluses à un circuit sur une machine Prismaflex tout en garantissant une bonne fluidisation.

Il est communément admis qu'il faudrait au minimum 10 à 20 milliards d'hépatocytes (environ 150g) dans une circulation extracorporelle bioartificielle pour pouvoir démontrer une efficacité chez un adulte d'environ 80kg. Si la densité cellulaire au sein des billes d'alginate peut avoisiner 20 à 40 Millions par ml de billes en lit tassé, cela signifie qu'il faudrait au minimum 500mL à 1000ml de lit de billes pour obtenir une suppléance efficace. Une cartouche MARS, qui a un volume de 250mL, peut être remplie au maximum avec 160ml de billes d'alginate en lit tassé pour générer une porosité de 0,45 en fluidisation. Il faut alors 4 cartouches pour disposer d'un volume d'environ 600mL de billes, ce qui est probablement insuffisant pour traiter un adulte mais assez conséquent pour un patient de moins de 40kg ou une application à un modèle préclinique porcin de faible poids.

L'intégration d'une cartouche MARS au circuit pose plusieurs types de problématique. En premier lieu, il faut que les billes puissent être incorporées au bioréacteur, de manière simple et sûre, une fois le circuit rempli. De plus, en phase de traitement, il faut pouvoir garantir un débit de fluidisation correcte dans le bioréacteur. Ces points sont abordés de façon plus spécifique dans les parties suivantes.

IV.1.1.1 Perfusion des bioréacteurs

Il a été observé qu'il fallait pouvoir perfuser le bioréacteur avec un débit aux alentours des 15ml/min à 30ml/min pour obtenir une porosité de 0,45 à 0,5 dans un plasma à 45g/L (cf. III.3.3.3). Le débit optimal est suceptible de varier suivant les patients et au cours du traitement du fait de la variabilité de la masse volumique du plasma. De plus, il convient d'assurer le débit de perfusion le plus important possible pour favoriser les échanges et limiter les gradients de température. Si quatre à huit bioréacteurs doivent être placés en parallèle, le débit de perfusion plasmatique globale doit pouvoir atteindre les 200 ml/min. Cependant, le débit de plasma extrait du plasmafiltre lors d'une plasmaphérèse classique ne peut pas être supérieur à 30% du débit du sang au risque de provoquer une thrombose ou une hémolyse. De plus, pour des traitements longs comme celui envisagé pour le projet SUPPLIVER, il conviendra d'abaisser grandement la fraction filtré (de 15 à 20%).

Une boucle de recirculation a donc été prévue dans le circuit dans le but de garantir une perfusion correcte du bioréacteur. La pompe de recirculation permet de produire une fluidisation indépendante du débit sanguin du patient.

Elle permet de pouvoir isoler les bioréacteurs du reste du circuit, tout en maintenant la circulation dans les bioréacteurs, pour une éventuelle mise en route de la culture cellulaire en effectuant des dosages (glucose, oxygène…) ou des mesures de viabilité cellulaire pour s'assurer que le système est opérationnel avant le branchement du patient. La recirculation permet aussi un isolement du bioréacteur par rapport au patient en cas de problème au cours de la thérapie.

IV.1.1.2 Introduction des billes dans le bioréacteur

L'introduction des billes dans le bioréacteur est une phase essentielle dans la procédure car celle-ci doit avoir lieu une fois le circuit totalement rempli. En effet, les cellules encapsulées représentent la composante principale et la plus fragile du traitement. Elles ne doivent être insérées dans la circulation extracorporelle que lorsque l'ensemble du circuit est rempli et vérifié. Le maintien de la stérilité doit être assuré lors de l'introduction des billes dans le bioréacteur, en tenant compte des contraintes logistiques : on ne peut pas, comme dans les essais à petite échelle *in vitro*, ouvrir la cartouche par son extrémité supérieure et la remplir directement.

Une introduction automatique des billes dans le bioréacteur a donc été étudiée. La cartouche a été équipée d'un robinet qui permet l'arrivée des billes, contenues dans une poche souple, directement entre les deux tamis du bioréacteur (cf. figure 136).

Figure 136: Introduction des billes par un robinet

Une réflexion a été menée quant à la meilleure option concernant l'introduction des billes. Dans tous les cas, le remplissage doit se faire avec une perfusion vers le haut du bioréacteur pour éviter que les billes ne soient écrasées contre le tamis inférieur. Un robinet situé en bas du bioréacteur permet de faire sédimenter au plus vite les billes et les empêchent de se coller au tamis supérieur.

Dans certains essais, le robinet a été incliné pour générer un mouvement qui, lors de l'introduction des billes, imite la fluidisation et diminue les zones de stagnation et de recirculation. Une zone de recirculation est malgré tout observée et il ne semble pas que le gain sur le mouvement justifie la complexification de fabrication induite par l'inclinaison du robinet. Par la suite, un robinet non incliné a été conservé.

Si le robinet doit être situé le plus proche possible du tamis inférieur, on peut alors envisager d'amener les billes stockées dans une poche par l'intermédiaire d'une pompe située sur (option A) ou en aval (option B) de la ligne d'introduction des billes (cf. figure 137)

Dans l'option A, la dégradation éventuelle des billes lors de leur passage par la pompe péristaltique a été testée à différents débits (de 25 à 100 ml/min). Les billes sont observées à la loupe binoculaire et aucune dégradation des billes n'est visible quel que soit le débit imposé. Cependant, il demeure que cette option induit un risque significatif de dégradation mécanique des billes d'alginate.

Dans l'option B, les billes sont introduites par la création d'une dépression dans le bioréacteur. Les billes ne passent donc pas dans un corps de pompe et cela évite en partie les risques d'endommagement et de stress mécanique pour les cellules.

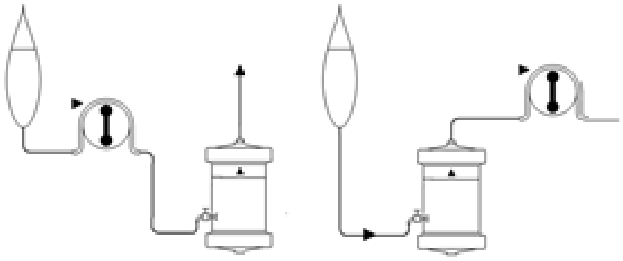


Figure 137: De gauche à droite : remplissage en dépression avec une pompe sur la ligne d'introduction (option A) et remplissage en pression avec une pompe en aval du bioréacteur (option B)

Une seule pompe peut servir à la fois à la recirculation et à l'introduction des billes grâce à l'ajout, à la sortie du bioréacteur, d'une valve anti-retour et d'une vanne trois voies au niveau de la pompe de recirculation (cf. figure 138).

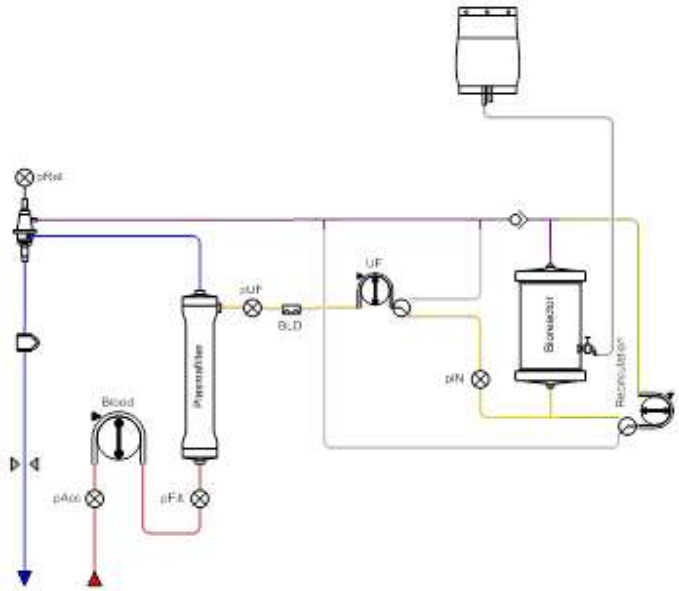


Figure 138: Schéma d'une version intermédiaire du circuit SUPPLIVER

Lors de la phase d'introduction des billes, les billes, qui sont dans une poche, sédimentent et sont difficilement aspirées par la pompe. Une poche spéciale en forme de V a donc été créée par thermocollage pour faciliter l'introduction des billes. Le volume de billes introduit est donc contrôlé et aucune agitation ni autre action manuelle n'est à effectuer (cf. figure 139).

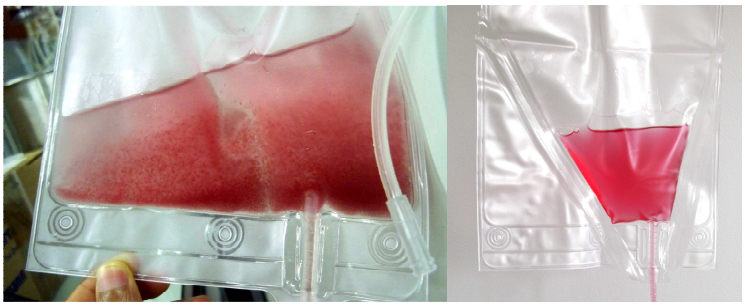


Figure 139: De gauche à droite : Problème de sédimentation des billes dans une poche standard et poche en forme de V

Pour la suite du projet, il faudra envisager de faire appel à un fabricant de poches pour concevoir une poche adaptée à notre application (notamment si les billes sont congelées dans ces poches). La société MacoPharma, par exemple, commercialise des poches de culture cellulaire utilisables pour la congélation.

Dans une thérapie classique de plasmafiltration, l'amorçage du circuit est réalisé avec un sérum physiologique, avant le premier passage du sang qui « pousse » le sérum physiologique. Du fait du volume important du circuit SUPPLIVER, un priming avec un équivalent du plasma est envisagé pour limiter l'hémodilution (avec une solution d'albumine par exemple [105]). Pour l'étape de l'introduction des billes, la question de la méthode de « priming » a été posée, car l'état dans lequel allaient arriver les billes au lit du patient était non identifié. Il a donc fallu imaginer des étapes de rinçage ou de culture cellulaire qui seraient éventuellement nécessaires avant le démarrage du traitement proprement dit.

Trois scenarii ont été envisagés (Fig. 140) :

- un priming avec un équivalent du plasma, simplifié par le fait que les billes sont déjà conditionnées dans un milieu équivalent,
- une condition équivalente, mais avec des billes initialement conditionnées dans un milieu à éliminer (milieu de culture, par exemple),
- et une condition où les cellules encapsulées sont décongelées directement avant leur introduction dans le bioréacteur.

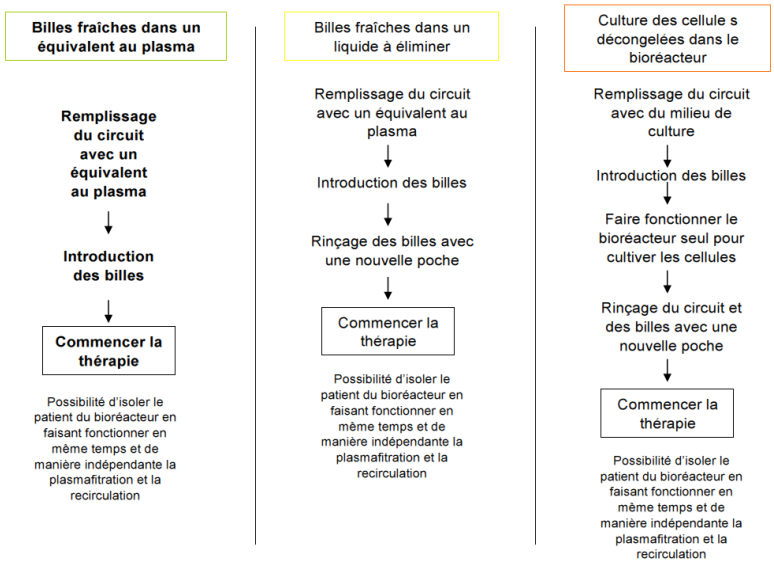


Figure 140: Etapes de priming du circuit secondaire en fonction de l'état des cellules avant la thérapie

Pour faciliter le déroulement de la thérapie, il semble impératif que les billes soient déjà décongelées et débarrassées de toutes substances ou débris indésirables avant le conditionnement sous poche. Le circuit devra être rempli avec une solution équivalente au plasma et les billes seront ensuite introduites (elles même peuvent être conditionnées dans une solution d'albumine).

L'idéal serait que les procédés en amont (encapsulation, cryopréservation et conditionnement) soient suffisamment contrôlés pour assurer une qualité cellulaire irréprochable avant l'introduction des billes dans les bioréacteurs.

En utilisant la recirculation, indépendamment du circuit de plasmaphérèse, une étape de fluidisation fait directement suite à l'introduction des billes, ce qui peut permettre de procéder à une mise en route biologique du système en attendant la connexion du patient et le début de la thérapie. L'étape d'introduction des billes remplace alors la phase d'expansion du lit fluidisé ou les billes s'élèvent progressivement dans la colonne (cf. figure 141).

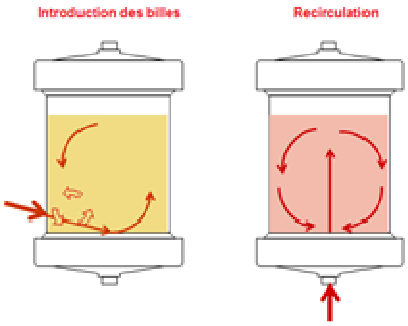


Figure 141: Schéma du principe de fluidisation directe

IV.1.2 Garantie d'une fonctionnalité optimale des cellules

IV.1.2.1 Optimisation du nombre de cellules contenues dans le bioréacteur

Comme vu précédemment, il a été décidé d'utiliser 4 cartouches dans le circuit extracorporel conçu pour des patients de petits poids ou pour le modèle préclinique.

Deux choix se présentent alors : inclure ces cartouches en série ou en parallèle. La première option à l'avantage de ne demander qu'un débit faible de perfusion égal à celui nécessaire pour un bioréacteur. La boucle de recirculation incluse dans le circuit permet cependant d'avoir des débits importants (jusqu'à environ 200ml/min) ce qui permettrait de perfuser sans problème jusqu'à huit bioréacteurs en parallèle. D'un autre côté, si les bioréacteurs fonctionnent en parallèle, des chemins préférentiels (différences de débits en sein des cartouches) et donc des fluidisations inégales sont à redouter. Des essais de fluidisation avec du liquide physiologique ont été effectués dans le but de s'assurer que les fluidisations sont équivalentes dans chacun des quatre bioréacteurs.

Les écarts de débit entre les cartouches sont conditionnés par les variations relatives de pertes de charge entre les différentes branches du circuit en parallèle. L'introduction d'une perte de charge additionnelle calibrée a été testée pour rendre le système plus robuste.

La perte de charge est faible dans un bioréacteur (moins de 10mmHg). En ajoutant une perte de charge calibrée de 25mmHg, de manière équivalente dans chacune des branches de la circulation des cartouches, les différences de perte de charge entre les bioréacteurs deviennent moins significatives.

Pour augmenter la perte de charge de 25mmHg, dans chaque branche de la circulation en parallèle incluant un bioréacteur, un morceau de 10 cm de ligne à héparine (diamètre 0,85 mm) a été ajouté en amont de chaque bioréacteur.

Pour calculer la longueur nécessaire à l'obtention d'une perte de charge additionnelle de 25 mmHg la formule de Hagen Poiseuille a été utilisée :

$L = \Delta P \pi D^4 / 128 \mu Q$ avec $\mu = 1.10^{-3}$Pa.s, $Q = 25/60.10^{-6} m^3/s$, $\Delta P = 3334$Pa et $D = 0,85.10^{-3}$m

L = 10cm

Deux tests en laboratoire ont été réalisés en mesurant la perte de charge d'un segment de ligne à héparine pour valider le calcul: un avec l'ajout d'un segment de ligne de 1 cm (créant une perte de charge additionnelle quasiment nulle) et un essai avec un segment de 10 cm (créant une perte de charge additionnelle d'environ 25mmHg) (cf. figure 142).

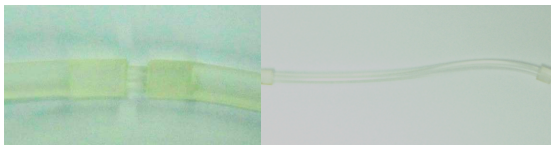


Figure 142: Collages des lignes à héparine sur les lignes en amonts des bioréacteurs

La fluidisation s'est faite de manière équivalente dans les 4 cartouches que ce soit avec des lignes d'1 ou de 10cm (cf. figure 143 à 145).

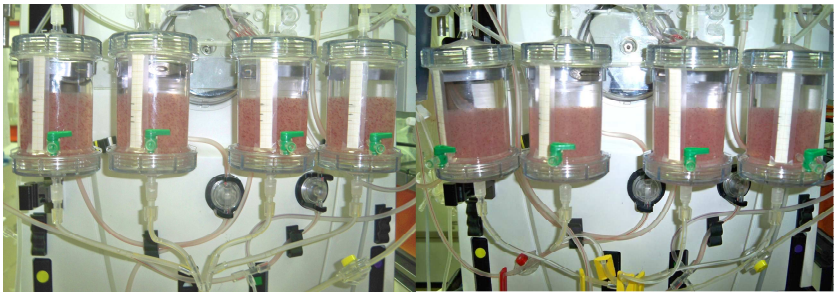


Figure 143: Photo de la fluidisation avec une ligne à héparine de 1 cm (à gauche) et de 10cm (à droite) à 25 ml/min par bioréacteur

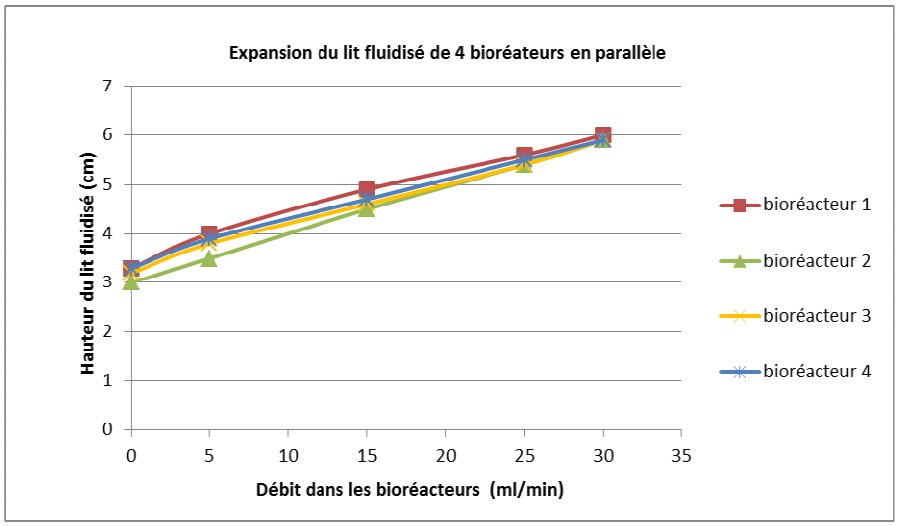


Figure 144: Graphique de l'évolution de la hauteur du lit fluidisé en fonction du débit dans les bioréacteurs en parallèle avec une ligne à héparine de 1 cm

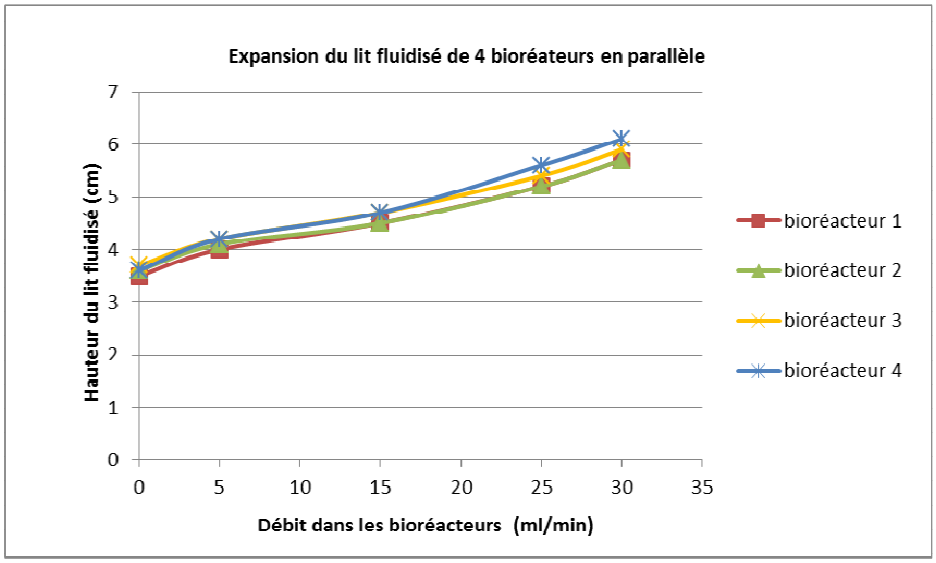


Figure 145: Graphique de l'évolution de la hauteur du lit fluidisé en fonction du débit dans les bioréacteurs en parallèle avec une ligne à héparine de 10 cm

Les différences de hauteur observées (de 0 à 15%) peuvent être dues à plusieurs imprécisions. Parmi ces imprécisions, la quantité de billes introduites (80ml) joue sur le niveau du lit. La lecture du niveau du lit comporte une certaine marge d'erreur. De plus, l'inclinaison des bioréacteurs (qui ne sont pas strictement sur un axe perpendiculaire au sol) augmente l'erreur de lecture. Enfin, les segments de ligne héparine sont coupés avec une précision moyenne.

Dans les deux expérimentations, les bioréacteurs montrent des fluidisations plutôt similaires. L'ajout d'une perte de charge de 25mmHg, ne se semble pas améliorer grandement l'homogénéité des fluidisations. Ceci est à nuancer par le fait que l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Le collage des lignes à héparine doit être fait avec soin. En effet, des dépôts de colle peuvent venir obstruer partiellement la ligne à héparine qui a diamètre très fin. Pour ces raisons, les pertes de charges calibrées n'ont pas été rajoutées au circuit final.

La mise en parallèle des bioréacteurs ne semble donc pas gêner de façon significative la réponse en termes de fluidisation. Ce sont donc plutôt les pertes thermiques qui pourront guider le choix final (voir paragraphe suivant).

IV.1.2.2 Maintien d'une température de 37°C au sein des bioréacteurs

Un des points clefs de la conception du circuit extracorporel est la gestion des températures et du réchauffage. En effet, d'un côté les cellules ont besoins d'une température au plus proche des 37,4°C physiologiques et d'un autre côté le patient ne doit pas subir de pertes thermiques trop importantes pour ne pas faire d'hypothermie trop sévère.

De premières mesures de température ont été réalisées avec de l'eau dans une version améliorée du circuit SUPPLIVER contenant un réchauffeur/oxygénateur (le Hilite 800), et d'autres éléments artificiels (cartouches de détoxification et un filtre à particules) (cf. figure 146). Ces éléments ajoutés au circuit vont être présentés plus en détails dans les parties suivantes.

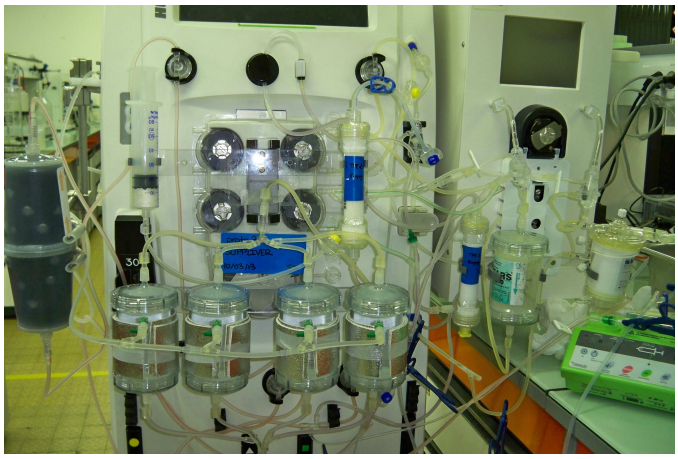


Figure 146: Circuit utilisé pour les essais de pertes thermiques

Les mesures des thermocouples et les calculs de pertes thermiques (cf. II.4.1.4.2) sont présentés dans le tableau 12. Six conditions opératoires différentes ont été analysées.

Tableau 12: Résultats des mesures de température

		Tentrée (℃)	Tsortie (℃)	ΔT (℃)	Pertes thermiques (W)
1 Sang=80ml/min UF=22,5ml/min Recir=0ml/min					
sans Hilite	Sang	37,4	30,6	6,8	37,9
Cartouches en série	Bioréacteurs	27,8	24	3,8	5,9
2 Sang=80ml/min UF=22,5ml/min Recir=0ml/min		Tentrée (℃)	Tsortie (℃)	ΔT (℃)	Pertes thermiques (W)
Hilite 400ml/min 40℃ sans air	Sang	37,4	31,8	5,6	31,3
Cartouches en série	Bioréacteurs	38,9	30,8	8,1	12,7
3 Sang=80ml/min UF=22,5ml/min Recir=67,5ml/min		Tentrée (℃)	Tsortie (℃)	ΔT (℃)	Pertes thermiques (W)
Hilite 400ml/min 40℃ sans air	Sang	37,7	32,8	4,9	27,3
Cartouches en parallèle	Bioréacteurs	38,8	36,2	2,6	16,3
4 Sang=80ml/min UF=22,5ml/min Recir=67,5ml/min		Tentrée (℃)	Tsortie (℃)	ΔT (℃)	Pertes thermiques (W)
Hilite 400ml/min 40℃ sans air	Sang	37,7	33,1	4,6	25,7
Cartouches en parallèle avec isolant	Bioréacteurs	38,8	36,8	2	12,6
5 Sang=80ml/min UF=22,5ml/min Recir=67,5ml/min		Tentrée (℃)	Tsortie (℃)	ΔT (℃)	Pertes thermiques (W)
Hilite 400ml/min 40℃ air 1L/min	Sang	37,7	33,1	4,6	25,7
Cartouches en parallèle avec isolant	Bioréacteurs	38,6	36,6	2	12,6
6 Sang=80ml/min UF=22,5ml/min Recir=67,5ml/min		Tentrée (℃)	Tsortie (℃)	ΔT (℃)	Pertes thermiques (W)
Hilite 400ml/min 40℃ air 2L/min	Sang	37,7	33,2	4,5	25,1
Cartouches en parallèle avec isolant	Bioréacteurs	38,4	36,3	2,1	13,2

Dans la première condition, le circuit contenant des cartouches en série n'a pas été réchauffé par le réchauffeur et seule le circuit primaire a été mis en circulation avec un débit sanguin de 80ml/min. Le sang retournant au patient a perdu 5,3°C soit une perte thermique de 29,5W Le circuit plasmatique a ensuite été mis en route (perfusion des bioréacteurs à 22,5ml/min) sans chauffage. La différence de température monte à 6,8°C au total (37,9W) avec une perte de température de 3,8°C (5,9 W) dans le circuit plasmatique entre l'entrée et la sortie des bioréacteurs.

Dans la seconde condition, le réchauffeur Hilite est inséré et fonctionne avec un débit de 400ml/min d'eau chauffée à 40°C sans circulation d'air ni d'oxygène. La perte thermique diminue quelque peu. Une différence de température totale de 5,6°C, soit 31,2W de pertes totales, est observée avec 8,1°C de différence entre l'entrée et la sortie des bioréacteurs.

Dans la troisième condition, le circuit a été revu pour mettre les cartouches en parallèle. Dans cette configuration, un débit quatre fois plus important passe dans le circuit plasmatique (la recirculation est alors mise en route pour assurer un tel débit). Les pertes thermiques ne sont que légèrement diminuées par l'augmentation du débit dans le circuit secondaire (27,3W au lieu de 31,2W). Mais, il y a seulement 2,6 °C de différence entre l'entrée et la sortie des bioréacteurs. Le sang du patient sortirait du circuit avec près d'un degré de plus.

Pour améliorer les performances, des couches d'isolant à base de polyester et d'aluminium peuvent être placées autour des cartouches (condition 4). 0,6°C sont gagnés dans les bioréacteurs mais la visualisation du lit fluidisé est alors difficile. Avec cette isolation, le sang du patient sortirait du circuit avec 0,3°C en plus soit à 33,1°C.

En plus du rôle de réchauffeur, le dispositif Hilite sera utilisé dans le circuit comme oxygénateur. De l'air y est envoyé pour simuler cette oxygénation et voir l'effet qu'elle aurait sur les pertes thermiques du circuit (conditions 5 et 6). Un refroidissement est induit par l'évaporation saturant en vapeur d'eau le gaz circulant dans l'oxygénateur. L'effet est cependant très faible lorsqu'on a un débit d'air de 0 à 2L/min dans le Hilite.

Ces expérimentations ont permis d'imposer le choix d'une configuration en parallèle des bioréacteurs. Le suivi de la température par des sondes non invasives pourrait s'avérer utile dans la gestion des risques et la mise en place d'une alarme.

IV.1.2.3 Maintien d'un taux d'oxygène important au sein du circuit secondaire

Dans l'organisme, le plasma est relativement pauvre en oxygène dissous (moins de 10mg/mL) puisque le transport d'oxygène est assuré par les globules rouges. Cependant, il est essentiel d'assurer une oxygénation correcte pour les cellules hébergées dans le bioréacteur. Pour avoir des cellules aussi fonctionnelles que possible, le rôle d'oxygénateur du dispositif Hilite 800 a donc été étudié.

Cependant, cet oxygénateur a été conçu et mis sur le marché pour être utilisé avec du sang, et non avec du plasma (cf. tableau 13). Il est donc employé ici dans des conditions particulières qui n'ont pas été explorées jusqu'à présent.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de qualifier l'oxygénation plasmatique à l'aide de ce dispositif. Des résultats préliminaires de mesure de consommation d'oxygène ont ensuite été obtenus avec des cellules cultivées en fluidisation avec une oxygénation. Enfin, la fonctionnalité de ces cellules a été comparée à celle de cellules n'ayant pas reçu d'oxygénation.

Tableau 13 : Conditions initiales d'utilisation du Hilite 800 et modifications apportées (les modifications sont indiquées par un rayage et un surlignage)

	Hilite 800
Priming	Remplissage du haut vers le bas - Rinçage avec 1000ml de liquide physiologique hépariné 5000UI/L - Coating Rhéoparine (17UI) - ~~Débit 300mL/min~~ 150ml/min - Retournement pour dégazage
Traitement	Utilisation sur du ~~sang~~ plasma Débits maximal: ~~0,8L/min (sang)~~ 100ml/min (plasma) 1,6L/min (oxygène) - 24h
Restitution du sang	Pas de spécifications Restitution du plasma

IV.1.2.3.1 Capacité d'oxygénation de l'oxygénateur Hilite 800

Un banc d'essais a été réalisé pour des essais à taille réelle à partir d'une étude bibliographique [106] [107]. Les débits et volumes sont similaires à ceux utilisés lors de la thérapie SUPPLIVER (cf. figure 147).

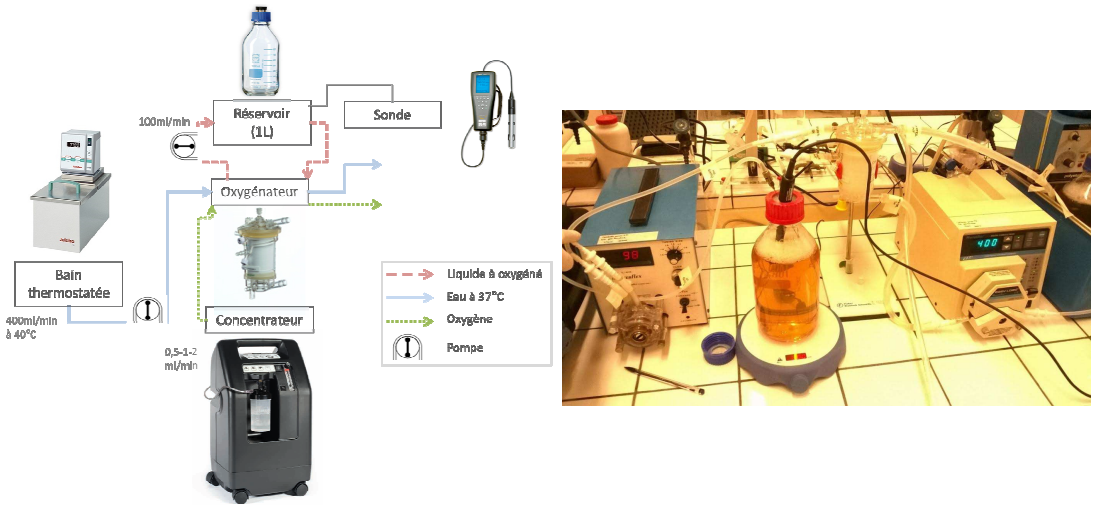


Figure 147: Schéma et photo du banc d'essai utilisé pour la mesure de l'oxygénation à taille réelle

Les capacités d'oxygénation du Hilite 800 ont été mesurées dans de l'eau ultrapure (MiliQ) et dans du plasma dilué à 20g/L de protéines totales avec le banc d'essai de taille réelle. Le débit d'oxygène du concentrateur n'influence pas l'oxygénation. Une certaine saturation du plasma semble apparaitre autour d'une concentration d'oxygène de 20mg/L, mais il faut noter qu'il s'agit aussi de la limite de détection de la sonde à oxygène. Le transfert (flux) d'oxygène ou vitesse d'oxygénation du fluide est de l'ordre de 0,7mg/ml/min pour l'eau comme pour le plasma. Il est calculé à l'aide des pentes des droites de corrélation des parties linéaire des courbes (cf. figure 148 et 149).

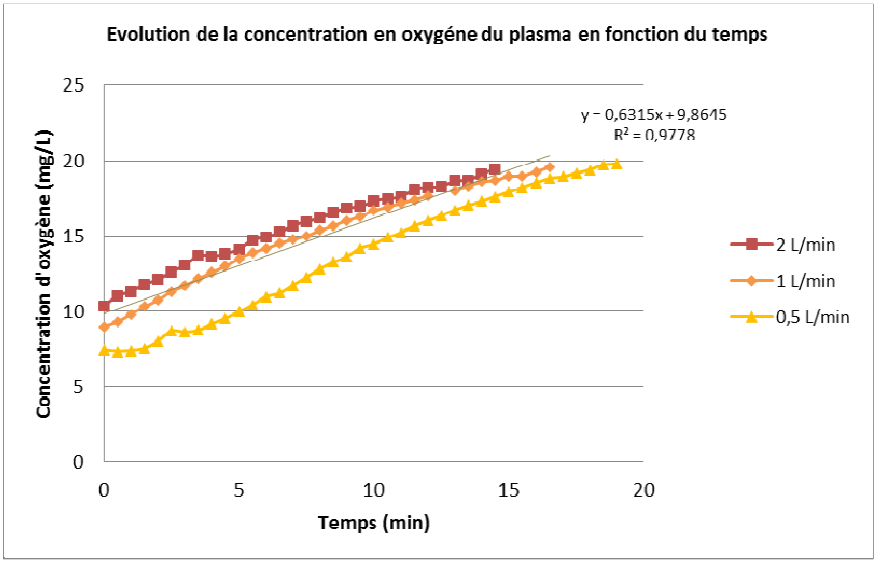


Figure 148: Evolution de la concentration en oxygène du plasma en fonction du temps pour différents débit d'oxygène dans un circuit de taille

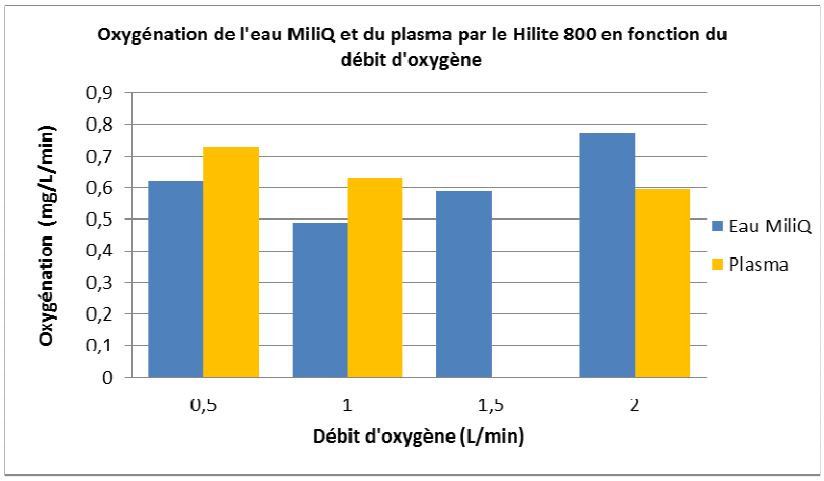


Figure 149: Oxygénation de l'eau MiliQ et du plasma par le Hilite 800 pour différents débit d'oxygène dans un circuit de taille réelle

IV.1.2.3.2 Résultats préliminaire de consommation d'oxygène et des effets d'une oxygénation sur la fonctionnalité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés

Les capacités d'oxygénation du dispositif Hilite sont à relier à la consommation en oxygène des cellules.

Un deuxième banc d'essai est réalisé à une échelle d'environ 1/300ème. La quantité de cellules encapsulées est limitée pour faciliter la réalisation des manipulations (3ml de billes d'alginate en lit tassé par bioréacteur soit 60M de cellules). Tout le circuit est placé dans un incubateur pour maintenir les cellules du bioréacteur à 37°C. Une étude de l'influence de l'oxygénation sur les hépatocytes a été réalisée grâce à ce banc. Un volume de 100ml (échelle 1/15ème) de sérum de veau fœtal dilué de moitié dans du liquide physiologique circule dans le circuit. Deux circuits sont mis en parallèle : un premier oxygéné et un autre non-oxygéné servant de témoin (cf. figure 150).

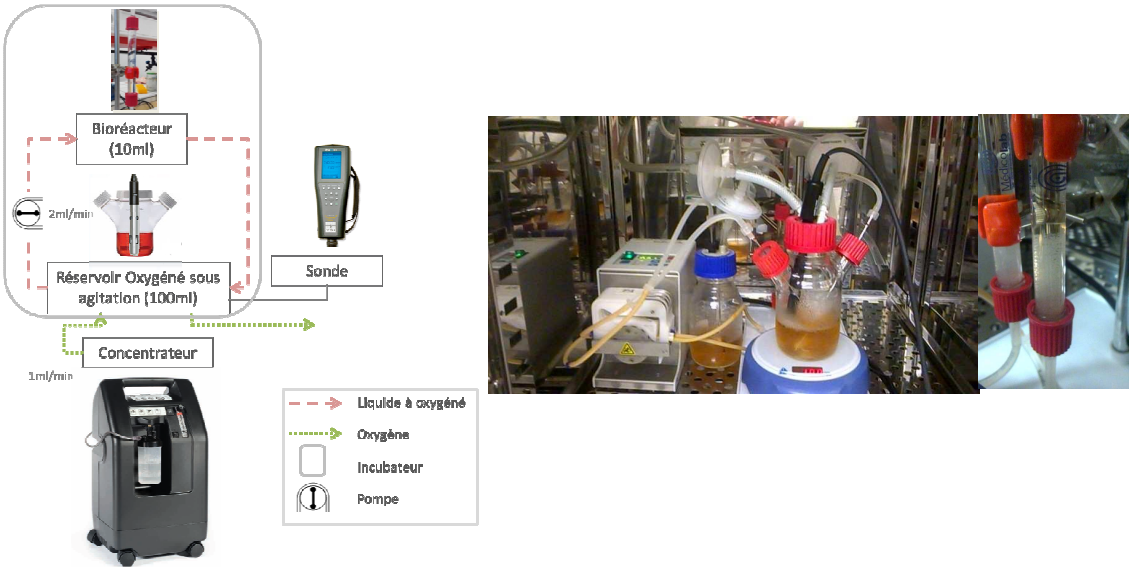


Figure 150: Schéma et photo du banc d'essai à taille réduite utilisé pour la mesure de la consommation des cellules et des effets de l'oxygénation sur les cellules

Dans un premier temps, la perméabilité à l'oxygène de l'alginate polymérisé à été vérifié avec des billes vides, en utilisant du ruthénium dont la fluorecence diminue si la concentration d'oxygène dans le milieu augmente. Les billes sont mises en contact avec une solution de ruthénium fluorescent. Selon les conditions testées, un bullage de CO2 ou d'O2 de quelques minutes est ensuite réalisé avant l'observation par microscopie confocale. En présence de CO2, l'ensemble de la bille est rouge, ce qui dénote de la relative absence d'oxygène. Une fois l'oxygène amené dans le milieu extérieur, on constate que la bille s'est chargée en O2, puisque sa fluorescence disparait. Ceci démontre les capacités de transferts bidirectionnels des gaz au sein des billes d'alginate. Le contour de la bille est tout de même légèrement visible, signe qu'il existe une faible différence de concentration entre le milieu d'immersion et l'intérieur de la bille (cf. figure 151).

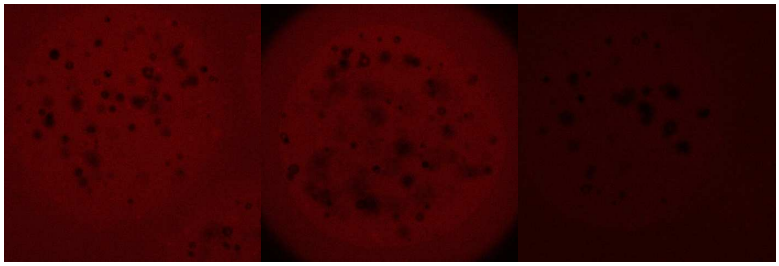


Figure 151: De gauche à droite : Billes d'alginate dans une solution de ruthénium fluorescent : après bullage de $C0_2$, à atmosphère ambiante et après bullage d'0_2 (microscopie confocale)

Les sphéroïdes de cellules C3A encapsulés ont été ensuite mis en culture avec une oxygénation élevée (1,2 mg/L/min) proche de l'oxygénation obtenue avec le Hilite 800 à grande échelle. Lors de la culture de cellules, la concentration d'oxygène du milieu est beaucoup plus faible que lors des essais précédents sans cellules et sans billes signe d'une consommation d'oxygène.

Cependant, la consommation calculée parait très importante [108]: 70µg/min pour 60M de cellules soit environ 0,6nmol/M/sec ou 23mg/min pour 20 milliards de cellules (cf. figure 152).

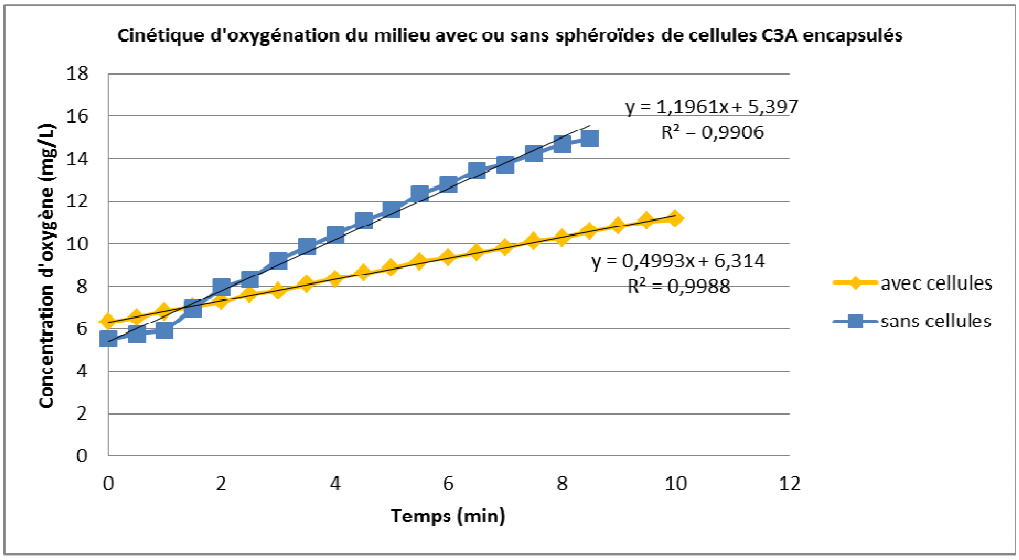


Figure 152: Evolution de la concentration en oxygène du sérum en fonction de la culture en fluidisation ou non de billes contenant des sphéroïdes de cellules C3A dans un circuit de taille réduite

Après 8 heures de culture, un marquage a été réalisé pour estimer la viabilité des cellules. Une observation au microscope à épifluorescence montre que la viabilité des cellules cultivées avec une oxygénation semble meilleure. Un cœur nécrotique semble apparaitre au centre des billes n'ayant pas reçu d'oxygénation supplémentaire (cf. figure 153).

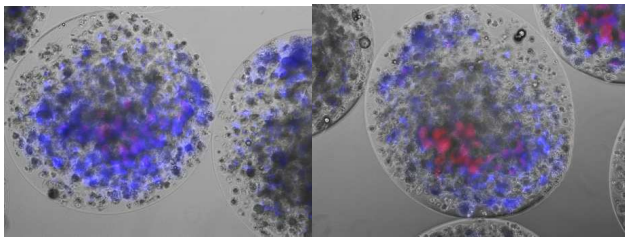


Figure 153 : Viabilité des cellules C3A après fluidisation (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). De gauche à droite : Avec et sans oxygénation

Concernant le métabolisme, il semble que l'oxygénation améliore la productivité des cellules pour ce qui est de la production d'albumine et surtout d'urée. Comme attendu, les cellules sous oxygénation produisent du glucose signe d'une activation de la néoglucogenèse ou de la synthèse de glucose à partir de lactate (cf. figure 154). Ces résultats seront néanmoins à confirmer par une campagne expérimentale plus complète qui n'a pas pu être menée dans le cadre de ce travail.

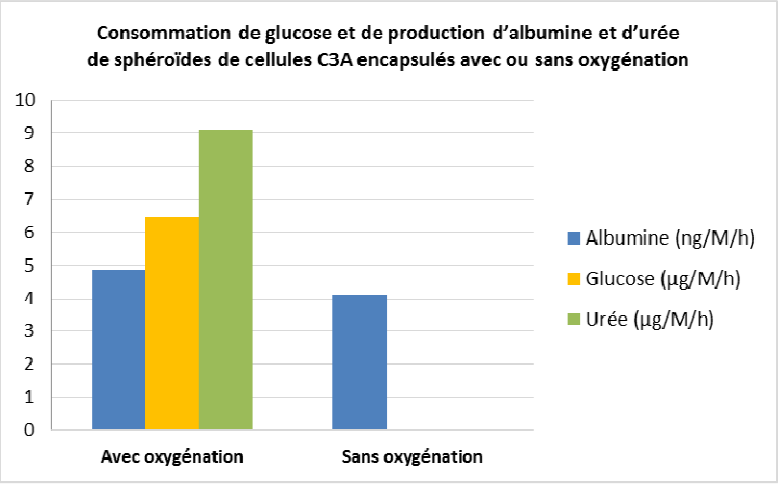


Figure 154: Résultats de consommation de glucose et de production d'albumine et d'urée de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés avec ou sans oxygénation

IV.1.2.4 Détoxification artificielle

Dans un certain nombre de cas cliniques, l'insuffisance hépatique aigüe peut être causée par la toxicité d'un xénobiotique (médicaments, substances toxiques, …). Une détoxification du sang du patient en début de séance permettrait d'éviter une atteinte des cellules encapsulées et d'améliorer l'efficacité de la thérapie, comme cela l'a déjà été fait avec des systèmes concurrents [54]. Deux dispositifs artificiels de détoxification sont disponibles dans la gamme Gambro : les cartouches Adsorba et IE250, déjà utilisés dans d'autres thérapies, mais dans des conditions différentes (cf. tableau 14). Dans le cadre de ce travail, seul le potentiel de la cartouche Adsorba, qui est en principe qualifiée en hémoperfusion pour un usage avec du sang total, a été ré-évalué.

Tableau 14: Conditions initiales d'utilisation des dispositifs Adsorba et IE250 et modifications apportées (les modifications sont indiquées par un rayage et un surlignage)

	Adsorba	IE250 (MARS)
Priming	Connexion manuelle - Rinçage avec 500ml dextrose et 2000ml de liquide physiologique hépariné (~~2500IU/L~~ 5000UI/L) - Débit 100-150mL/min	Connexion manuelle - Rinçage avec 1700ml de liquide physiologique ~~non hépariné~~ 5000 UI/L- Débit 150ml/min
Traitement	Utilisation sur du sang - Débit 50-150ml/min - ~~6h~~ 6h à 8h	Utilisation sur un ~~dialysat d'albumine~~ plasma - Débit 100-200ml/min - 24h
Restitution du sang	Retournement à la restitution 10-100ml/min	~~Pas de restitution (dialysat d'albumine)~~ Restitution du plasma

L'addition de dispositifs supplémentaires dans la circulation extracorporelle impose d'ajouter une pompe de priming pour pouvoir réaliser en parallèle le remplissage du circuit sanguin et celui du circuit plasmatique. Cette complexification du circuit, qui limite grandement la durée du priming, n'est souhaitable que si la détoxification artificielle permet réellement de préserver les cellules encapsulées. Toutefois, cette pompe de priming a l'avantage de pouvoir servir également à l'infusion de nutriments dans les bioréacteurs au cours du traitement.

L'ammoniac étant une des toxines s'accumulant dans l'organisme lors d'une insuffisance hépatique, il a un effet potentiel sur la viabilité et les fonctions des cellules hépatiques encapsulées dans le bioréacteur. L'évaluation de l'impact de la présence d'une colonne d'adsorption dans le système a donc été étudiée en présence d'ammoniac.

IV.1.2.4.1 Capacité d'adsorption de l'ammoniac de l'adsorbeur Adsorba

Du sang (2,5L) supplémenté en ammoniac à 8mg/ml (soit 1mM dans de plasma ce qui est environ 10 fois supérieur à une hyperammoniémie physiologique) ont été traités par une cartouche Adsorba (cf. figure 155). L'efficacité de la cartouche Adsorba a été estimer par des mesures de concentration d'ammoniac dans le plasma du sang traité au bout de 10 et 30 minutes de traitement.

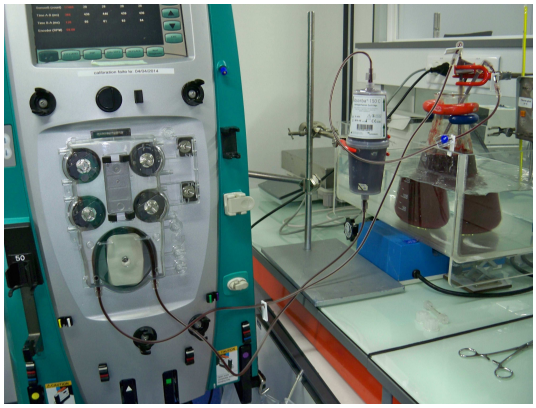


Figure 155 : Expérimentation de détoxification du sang par la cartouche Adsorba

La diminution d'ammoniac est assez faible par rapport à la concentration initiale mais importante par rapport à des concentrations physiologiques pathologiques (100µmol/L). La saturation semble apparaitre très rapidement puisque la concentration d'ammoniac est similaire après 10 minutes et 30 minutes de traitement. La capacité d'absorption de la cartouche peut donc être estimée à 250µmol (cf. figure 156).

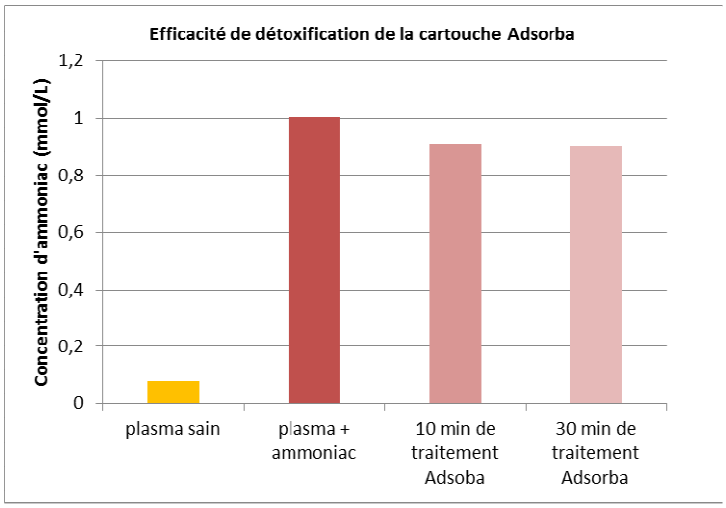


Figure 156: Evolution de la concentration d'ammoniac lors d'un traitement avec l'Adsorba

IV.1.2.4.2 Résultats préliminaires de toxicité de l'ammoniac et des effets d'une adsorption sur la fonctionnalité des sphéroïdes de cellules C3A encapsulées

Le lien entre l'efficacité de la cartouche Adsorba et l'amélioration de la productivité des sphéroïdes de cellules C3A a été investigué : des sphéroïdes encapsulées ont été mis en culture, dans des boites de Petri en agitation orbitale, pendant trois jours avec du plasma sain, du plasma avec ammoniac et du plasma traité pendant 10 minutes avec l'Adsorba.

Après trois jours de culture, un marquage a été réalisé pour estimer la viabilité cellulaire. Une observation au microscope à épifluorescence montre que la viabilité est bonne même pour des cellules soumises à une forte concentration d'ammoniac (cf. figure 157).

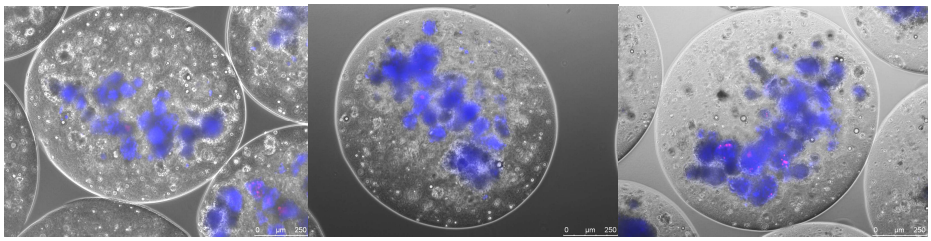


Figure 157: Viabilité des cellules C3A après culture (Hoechst / IP au microscope à épifluorescence). De gauche à droite : culture dans du plasma sain, du plasma avec ammoniac et du plasma après 10 minutes de traitement avec l'Adsorba

Des dosages montrent que la présence d'ammoniac semble diminuer la fonctionnalité des cellules concernant la production d'albumine et d'urée. Ce type de résultat a déjà été obtenu dans notre laboratoire dans des puces à cellules [109]. Le traitement à l'Adsorba s'avère être bénéfique pour les cellules surtout pour la production d'albumine. Par contre, on n'observe pas de biotransformation d'ammoniac en urée dans cette expérience, qu'il conviendra de répéter (cf. figure 158).

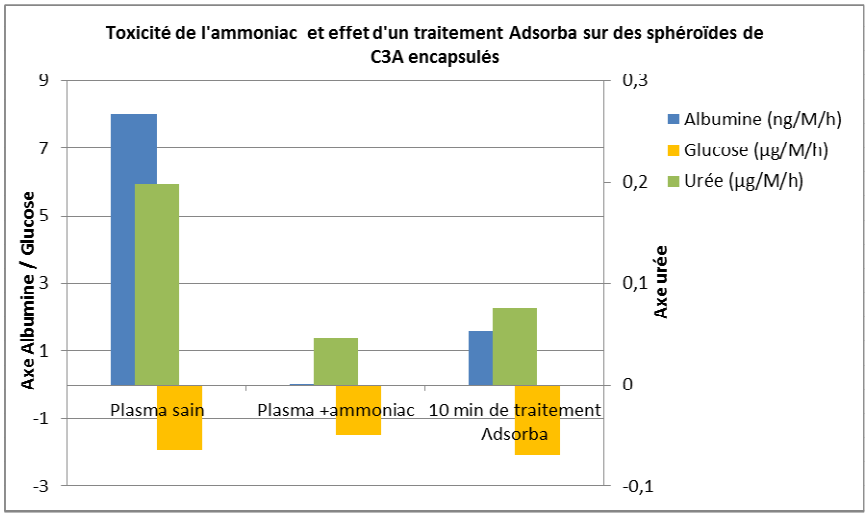


Figure 158: Résultats de consommation de glucose et de production d'albumine et d'urée de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés et cultivés dans du plasma sain, du plasma avec ammoniac et du plasma traité pendant 10minutes avec l'Adsorba

IV.1.3 Garantie de la sécurité du patient tout au long du traitement

La gestion des risques est un point essentiel du développement de nouveaux dispositifs médicaux et de médicaments de thérapie innovante faisant appel à des cellules. Dans cette partie, seuls les risques liés au traitement et associés à la composante biologique du dispositif sont étudiés. Les risques liés à la plasmaphérèse classique (coagulation, hémolyse..) ou à la circulation du plasma dans le circuit secondaire seront traités par la description des alarmes mises en œuvre dans la partie IV.2.5.

Le risque le plus critique provoqué par l'ajout d'une composante biologique est la possibilité d'une fuite de cellules jusqu'au patient. Même si cette fuite ne concerne qu'un petit nombre de cellules, celles-ci étant étrangères au patient il y a un risque de rejet. Les billes d'alginate permettent de protéger les cellules du stress mécanique mais leur résistance est tout de même assez faible. Une fuite de cellules peut être provoquée par une fuite des cellules en dehors des billes mais aussi par la rupture des billes ou la fuite de billes entières. L'ensemble de ces possibilités sont regroupées par la suite sous le terme de fuites de particules. Le risque de fuite de particules va être étudié plus en détails du fait de sa dangerosité.

IV.1.3.1 Analyse de risques

Pour mieux déterminer, prévenir et contrôler des éventuelles fuites de particules, une analyse des modes de défaillances, de leurs effets et de leurs criticités (AMDEC) et un arbre de défaillance ont été réalisés (cf. figure 159 et 160 et tableau 15 et 16).

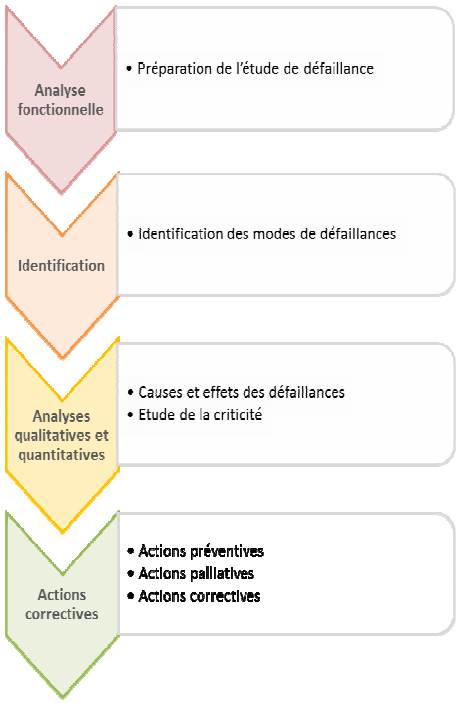


Figure 159: Principe de l'AMDEC

Si la qualité des billes est bien contrôlée, le risque de fuites de cellules en dehors de billes est très réduit. Cependant, pour la dégradation des billes au cours du traitement, le processus de fabrication du bioréacteur à lit fluidisé et son fonctionnement sont complexes et il est assez probable que des anomalies soient à l'origine d'un comportement non attendu du lit fluidisé (problèmes de densité ou de viscosité).

Pour simplifier, les risques concernant la fuite de particules peuvent être regroupés en deux types de défaillances de commande (risques plutôt liés au facteur humain) : un comportement anormal du lit, dû à des problèmes lors du fonctionnement du lit fluidisé, et une prescription d'un débit trop important menant à une forte élévation du lit fluidisé. D'un autre côté, il existe un risque de défaillance majeur qui est lié à un composant du bioréacteur. En effet, les tamis, d'une porosité de 40 microns, à chaque extrémité du bioréacteur sont susceptibles d'être endommagés et de laisser échapper des billes ou des fragments de billes contenant des cellules (cf. figure 160).

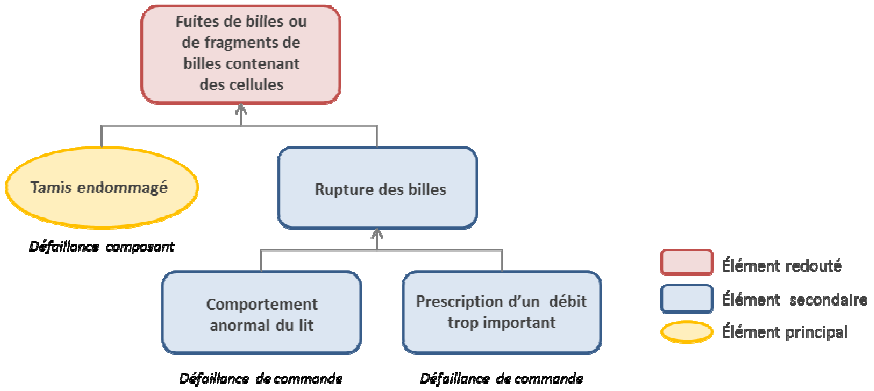


Figure 160: Arbre de défaillance simplifié de la fuite de particules

Parmi les modes de défaillances cités précédemment, l'analyse s'est focalisée sur les risques d'un comportement anormal du lit et d'une prescription d'un débit trop important (cf. tableau 16). L'importance de ces risques a été jugée grâce au nombre prioritaire de risque (cf. tableau 15). L'endommagement du tamis a été considéré comme moins critique puisque la cartouche utilisé comme bioréacteur est déjà commercialisée et que sa fabrication est déjà contrôler à échelle industrielle (contrôle visuel).

Les actions envisagées pour réduire les risques de fuite de particules sont de trois sortes : préventive, palliative et corrective. Une des solutions préventives serait d'inclure, sur les bioréacteurs, un détecteur de niveau qui permettrait le déclanchement d'une alerte dès que le niveau du lit est inhomogène ou lorsqu'il y a une expansion trop importante. L'ajout d'un filtre avec un seuil de coupure très fin serait une solution palliative. Enfin, une détection de particules échappées du bioréacteur serait intéressante pour informer l'utilisateur afin qu'il puisse mettre en place des actions correctives (cf. tableau 15 et 16).

Tableau 15: Calcul du nombre prioritaire de risque (NPR)

Cotation	Gravité (G)	Fréquence (F)	Détection (D)
1	Inexistant	Faible	A l'œil nu
3	Désagrément	Moyenne	Par un examen simple
5	Hors norme	Fréquent	Par un examen détaillé
8	Dangereux	Très fréquent	Par une analyse
10	Mortel	Tout le temps	Indétectable

NPR = GxFxD

Tableau 16: AMDEC sur la fuite de particules

Fonction ou Processus	Mode de défaillance	Causes	Effets	Mesures préventives/ Moyens de détection	G	F	D	NPR	Actions
Le tamis permet de garder les billes d'alginate, contenant les hépatocytes, à l'intérieur du bioréacteur tout en laissant s'écouler le plasma à l'intérieur de celui-ci.	Ecrasement des billes contre le tamis. Fuite de fragments de billes contenant les hépatocytes jusqu'au patient.	L'utilisateur a prescrit un débit trop important.	Le lit monte jusqu'à atteindre le tamis. Les billes s'écrasent contre celui-ci.	Gamme de débit conseillée pour l'utilisateur. Suivi de la pression du circuit.	8	3	1	24	Préventive: Capteur de niveau du lit Corrective: Détection des particules Palliative: Filtre à particules en aval du bioréacteur.
		Mauvaise préparation des billes par l'utilisateur conduisant à un comportement anormal du lit fluidisé au cours du traitement.	Les billes se dégradent. La gamme de débit conseillé ne correspond plus au bon fonctionnement du bioréacteur. Le lit monte jusqu'à atteindre le tamis. Les billes s'écrasent contre celui-ci.	Guide utilisateur pour la préparation des billes. Suivi de la pression du circuit.	8	2	4	64	Préventive: Capteur de niveau du lit Corrective: Détection des particules. Palliative: Filtre à particules en aval du bioréacteur,

De par ses spécifications une membrane de plasmafiltration peut remplir la fonction de filtre à billes et hépatocytes. Cela a été testé avec le passage d'une suspension de cellules isolées. Le milieu de culture à la sortie du filtre ne contenait aucune cellule. Le plasmafiltre génère cependant des pertes de charges gênant le bon fonctionnement de la circulation extracorporelle. De plus, le volume du filtre augmente le volume extracorporel total. Dans une étape ultérieure, il serait utile d'envisager son remplacement par un dispositif plus adapté. Jusqu'à présent, l'investigation s'est surtout penchée sur la détection des particules en aval du bioréacteur.

IV.1.3.2 Expériences de détection de billes vides entières

La machine Prismaflex dispose d'un détecteur de fuites de sang (BLD) qui détecte les globules rouges dans le plasma par une méthode spectrophotométrique. Il pourrait éventuellement permettre de détecter des billes ou particules de billes sorties du bioréacteur avant que celles-ci ne soient arrêtées par le filtre à particules.

Des premiers tests de calibration ont montré que les billes d'alginate transparentes n'étaient que faiblement détectées par le BLD. Nous avons néanmoins poursuivi les essais avec des billes d'alginate de diamètre 800 à 900 microns non colorées contenant 2g/100ml de microparticules de verre (cf. figure 161). Elles ont été placées dans du plasma de bœuf normalisé à 45g/l de protéines.

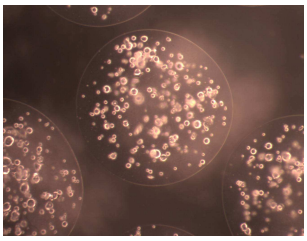


Figure 161: Billes d'alginate avec 2g/100ml de microparticules de verre fabriquées pour des essais de détection

Quand du plasma traverse la cellule du BLD, le signal est compris entre 45000 et 42000. Lors d'une fuite de billes entières, une baisse du signal jusqu'à 35000 est observée (Fig. 162).

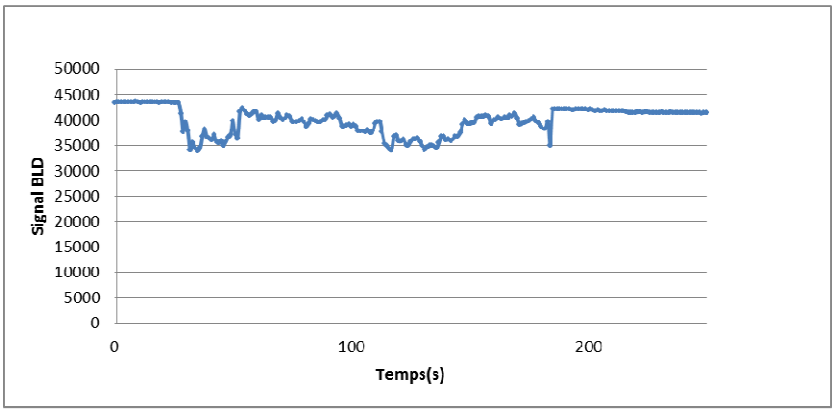


Figure 162: Graphique du Signal du BLD lors d'une fuite de billes chargées de microparticules de verre (2g /100ml d'alginate) dans du plasma à 45g/L de protéines totales.

A partir de ces résultats, le BLD semble pouvoir détecter des billes avec des microparticules de verre dans du plasma. Cependant les billes sont entières et on ne sait si les particules générées lors d'une fuite seront détectables. De plus, il est surement difficile de savoir à partir de quelle concentration de billes ou de fragments la détection a lieu .

En l'état actuel des développements, la limitation du risque de fuite de particules est obtenue en contrôlant le débit de fluidisation pour que les billes ne soient jamais en contact avec le tamis supérieur (contrôle visuel). Les risques d'endommagement du tamis ou des billes sont ainsi évités.

IV.2 DESCRIPTION DE LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE

La circulation extracorporelle SUPPLIVER développée comporte un plasmafiltre, quatre bioréacteurs en parallèle, un oxygénateur/ réchauffeur, des éléments de détoxification artificielle (charbon actif et cartouche échangeuse d'ions), un pousse seringue pour l'anticoagulation et un filtre à particule. Le circuit simplifié est présenté figure 163.

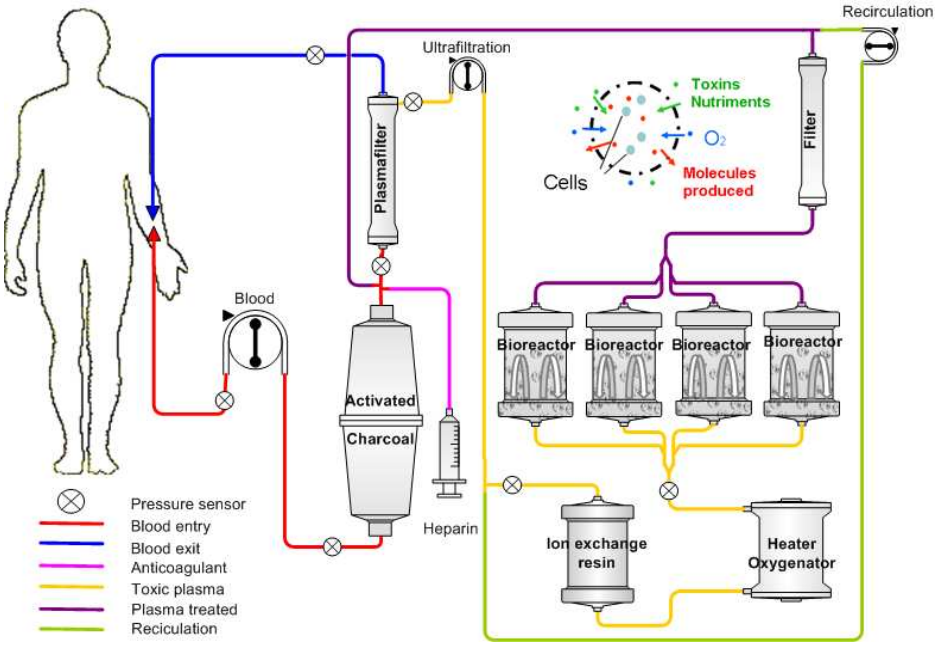


Figure 163: Schéma simplifié de la circulation extracorporelle SUPPLIVER

Un code couleur a été mis en place :

- Rouge : entrée du sang,
- Bleu : retour du sang,
- Jaune : plasma toxique,
- Violet : plasma purifié,
- Vert : recirculation du plasma,
- Rose : anticoagulation,
- Gris : lignes de service (sans intérêt pour la thérapie).

Des abréviations sont utilisées :

- BLD : détecteur de fuites sang,
- UABD : détecteur ultrasonique d'air dans le sang,
- UF : ultrafiltration,
- pAcc : pression accès (accès vasculaire),
- pIn : pression entrée filtre,
- pUF : pression d'ultrafiltration,
- pRet : pression retour.

Pour mettre en œuvre la thérapie SUPPLIVER, le logiciel X-Lab a été utilisé. Il permet de piloter n'importe quelles fonctionnalités de la machine sans les contraintes d'une thérapie spécifique. De plus l'interface mime celle de la machine en cours de traitement pour une visualisation réaliste des étapes de la thérapie nouvellement créée. Des écrans se succèdent au fur et à mesure que progresse la thérapie. Les écrans et séquences associées sont présentés dans les annexes 3 et 4.

IV.2.1.1 Mise en place du set

L'interface commence par présenter la thérapie SUPPLIVER au travers d'écrans d'accueil. Les étapes de mise en place sont décrites une à une. Une fois le set mise en place, il est chargé sur la machine Prismaflex.

IV.2.1.2 Amorçage au liquide physiologique

Une fois le set chargé sur la machine, des instructions sont données pour la préparation des solutions pour l'amorçage (rinçage et remplissage du circuit). L'amorçage nécessite 500ml de glucose (pour saturer la cartouche Adsorba et éviter un risque d'hypoglycémie lors du branchement du patient) et deux poches de 5L de liquide physiologique hépariné par traitement.

Lors de l'amorçage la seringue d'anticoagulation est connectée. Un pousse seringue non contrôlé par la machine Prismaflex permet d'administré l'anticoagulant. Le dosage d'anticoagulant n'est pas déterminé par la thérapie et se fera en fonction de la prescription médicale.

L'amorçage doit permettre le rinçage et le remplissage du circuit au liquide physiologique en éliminant tout air résiduel (pour pouvoir ensuite brancher le patient sans risquer d'embolie gazeuse). Cette étape de la thérapie est longue (40 minutes) car chaque composant du système (cartouches d'adsorption, plasmafiltre …) possède un cycle de rinçage différent pour éliminer divers résidus pouvant être toxiques.

L'amorçage des circuits sanguin et plasmatique se fait en parallèle grâce à la pompe sang (amorçage du circuit sanguin) et à une pompe dite de priming (amorçage du circuit plasmatique).

Les différentes étapes de l'amorçage sont schématisées à l'écran comme ci-dessous (cf. figure 163 à 168). La première étape de l'amorçage est le remplissage de la ligne de sang avant la connexion de la cartouche de charbon actif. La ligne d'anticoagulation est aussi remplie (cf. figure 163).

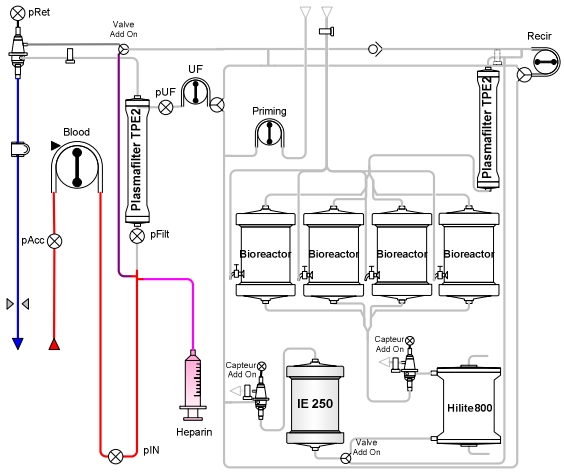


Figure 164: Amorçage de la ligne sang et de la ligne d'anticoagulation

L'étape suivante consiste au rinçage de la cartouche de charbon actif au niveau du circuit sanguin et au rinçage de la cartouche de billes échangeuses d'ions au niveau du circuit plasmatique (la ligne de recirculation est remplie).

Les effluents de rinçage sont déviés de façon à éviter leur circulation dans les dispositifs aval. Les pièges à bulles côté plasmatique sont liés à une seringue pour un remplissage manuel (cf. figure 165).

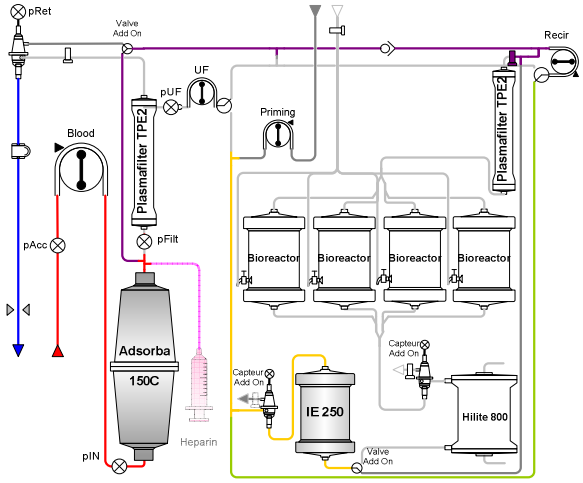


Figure 165: Amorçage de la cartouche Adsorba (charbon actif) et de l'IE250 (échangeuse d'ions)

L'amorçage du plasmafiltre se fait ensuite en deux parties (côté sang puis côté ultrafiltration). Puis viennent le remplissage de l'oxygénateur (qui est retourné pour un dégazage complet) et le remplissage des bioréacteurs (cf. figure 166). Le remplissage des bioréacteurs se fait aussi en deux parties. L'air situé en amont du premier tamis doit être évacué lentement en raison de la faible perméabilité du tamis à l'air. Dans le cas contraire des bulles d'air resteront piégées. Une étape est donc nécessaire, à débit lent, pour bien chasser l'air avant le passage du tamis du bioréacteur. Puis une fois le tamis passé, le débit est augmenté. Le plasmafiltre qui sert de piège à particules est aussi amorcé (cf. figure 167).

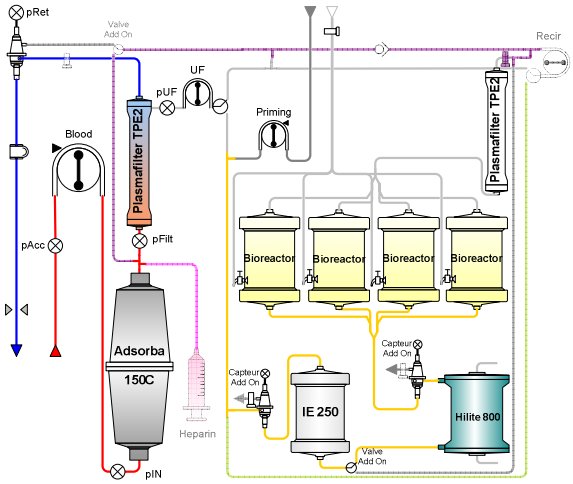


Figure 166: Amorçage du plasmafiltre (côté sang), de l'oxygénateur (Hilite) et des bioréacteurs (côté plasmatique)

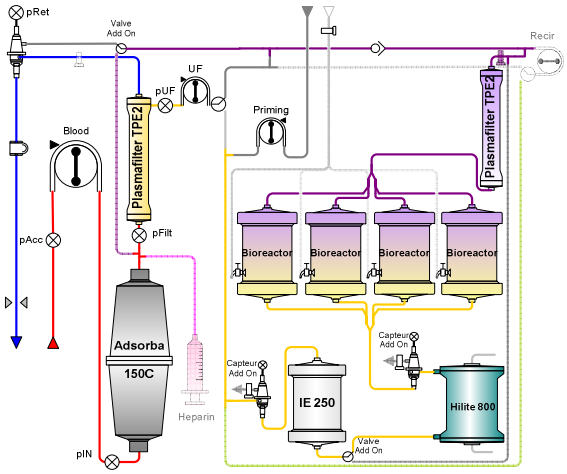


Figure 167: Amorçage du plasmafiltre (ultrafiltrat) et du filtre à particules

L'étape qui suit est l'amorçage des lignes d'introduction. Ces lignes permettent d'introduire les billes à l'intérieur des bioréacteurs (par l'intermédiaire des robinets) une fois le circuit amorcé. Pour remplir ces lignes d'introduction, la ligne violette est clampée à la sortie du filtre à particule et du liquide physiologique circule grâce à la pompe de priming. Le liquide s'évacue à travers les robinets dans une poche de recueil (cf. figure 168).

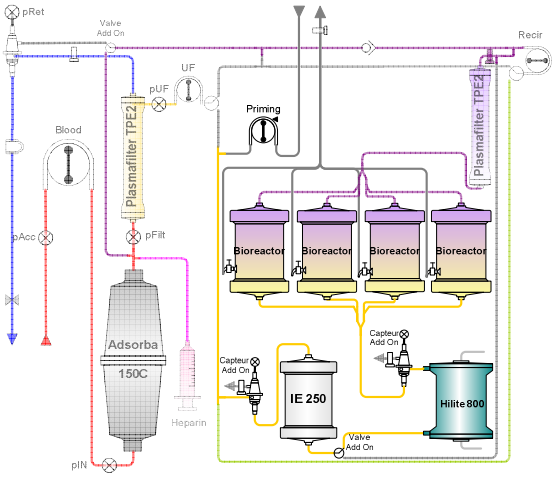


Figure 168: Amorçage des lignes d'introduction

Le priming du plasmafiltre en aval des bioréacteurs est poursuivi et le remplissage automatique du piège à bulles côté sang se fait ensuite.

Une fois l'amorçage terminé, l'utilisateur est amené à vérifier l'état du circuit. S'il reste de l'air piégé, il peut choisir de faire un amorçage manuel ou de relancer complètement l'amorçage. Il peut aussi régler la chambre de dégazage du piège à bulle Prismaflex.

L'amorçage se finalise par un test qui permet de détecter les fuites. Ce test consiste à mettre le circuit en pression (à 300 mmHg) et à monitorer cette pression sur une durée déterminée (10 secondes). Si une variation importante de la pression se produit, ceci indiquerait qu'il y a une fuite dans le circuit et le test n'est pas réussi. A la fin du test, il est possible de réamorcer le circuit, de relancer le test (s'il y a eu échec du test), de changer de circuit ou de passer à l'étape suivante (préparation des solutions pour le remplissage du circuit avec un équivalent au plasma).

IV.2.1.3 Amorçage avec un équivalent au plasma

Le volume extracorporel plasmatique de la thérapie SUPPLIVER est très important (plus d'1L). Ceci peut entraîner une hémodilution sévère lors du branchement du patient. Comme alternative à cette hémodilution, il a été proposé de remplir le circuit avec un équivalent au plasma (solution d'albumine ou plasma). Le choix a été fait de ne remplir avec cet équivalent que la partie plasmatique du circuit. L'hémodilution due au remplissage de la partie sanguine ne sera alors pas compensée comme dans le cas d'une circulation extracorporelle classique.

Les premières étapes de cet amorçage consistent à préparer, connecter les solutions et vérifier les connexions. Comme pour l'amorçage au liquide physiologique, les différentes étapes de l'amorçage à l'albumine ou au plasma sont schématisées à l'écran. Le circuit secondaire est d'abord rempli grâce à la pompe de priming (cf. figure 169).

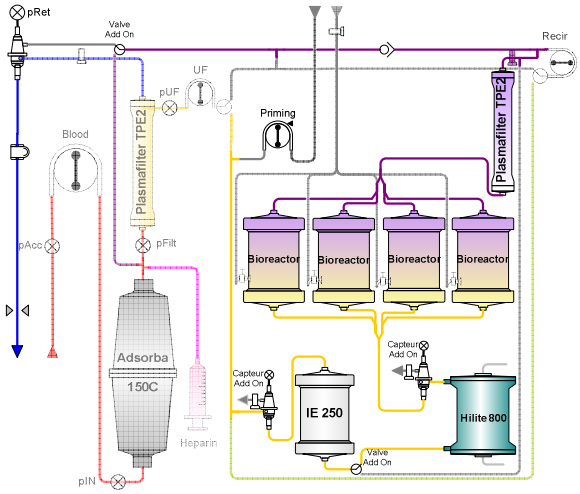


Figure 169: Amorçage avec un équivalent au plasma

Une fois l'amorçage terminé, si celui-ci n'a pas été suffisant, un amorçage manuel peut être fait ou l'amorçage peut être recommencé.

Puis, une homogénéisation est obtenue au moyen de la pompe de recirculation (cf. figure 170). Lors de l'étape d'homogénéisation, le circuit secondaire est réchauffé pour préparer l'introduction des billes contenant les cellules.

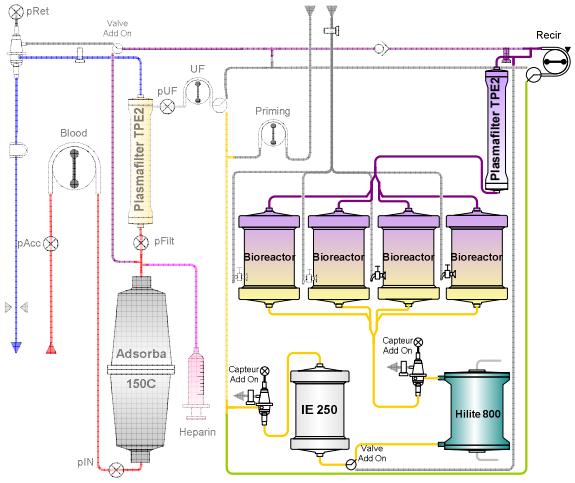


Figure 170 : Recirculation

IV.2.1.4 Introduction des billes

Une fois l'amorçage à l'albumine ou au plasma terminé, les bioréacteurs sont remplis avec les billes d'alginate. L'introduction des billes d'alginate se fait grâce à des poches (en forme d'entonnoir) permettant de contrôler précisément le volume de billes introduit. Chaque bioréacteur se remplit avec une poche contenant 125 ml de billes. Le volume de billes à introduire a été fixé arbitrairement et il est susceptible d'évoluer en fonction des développements à venir.

L'introduction des billes se fait par aspiration grâce à la pompe de recirculation (cf. figure 171). Tout de suite après l'introduction des billes (qui génère un mouvement semblable à celui d'une fluidisation), celles-ci sont mises à fluidiser par l'intermédiaire du circuit de recirculation. Le chauffage est alors en fonctionnement pour maintenir les cellules à 37 degrés. Cette étape dite de fluidisation directe permet d'initier la culture en dynamique des cellules (cf. figure 172).

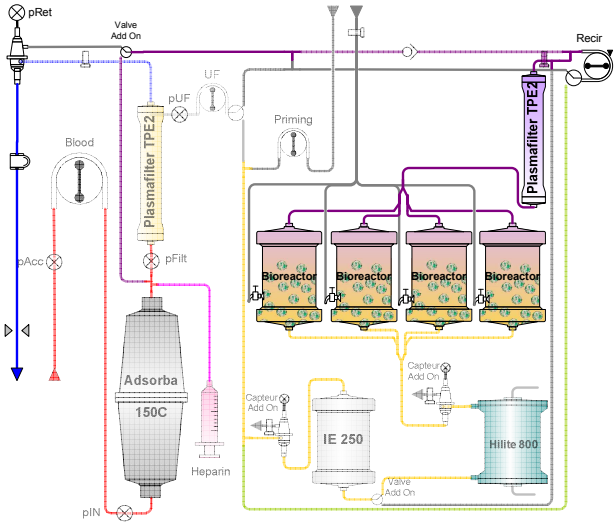


Figure 171: Introduction des billes d'alginate.

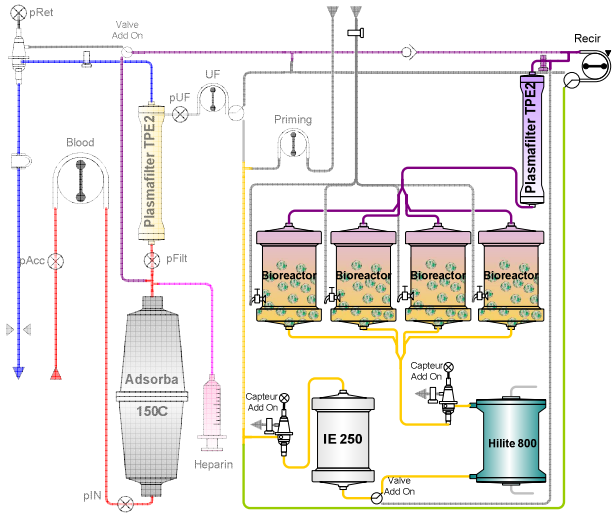


Figure 172: Fluidisation directe

L'étape suivante consiste au réglage du lit fluidisé. Le débit de recirculation est réglé pour obtenir la hauteur de lit souhaitée. Ce débit est ensuite enregistré pour être utilisé en thérapie comme débit de référence pour la fluidisation des bioréacteurs.

IV.2.1.5 Connexion, traitement du patient et gestion des alarmes

Le réglage des capteurs de pression intervient juste avant que le patient soit connecté au circuit. La ligne d'entrée du sang (rouge) et de retour du sang (bleu) sont connectées au cathéter du patient. Le circuit complet fonctionne alors en boucle fermée.

Pour avoir une hémodilution progressive au branchement, le sang circule initialement à un débit plus faible (100ml/min) que celui prévu pour la thérapie (180ml/min). La recirculation permet de maintenir la fluidisation au sein des bioréacteurs au débit enregistré avant la connexion du patient. L'écran de traitement, permet une visualisation des débits, de l'état des valves et des pressions (dont le calcul de la pression transmembranaire et de la différence de pression entre la sortie et l'entrée du plasmafiltre) (cf. figure 173).

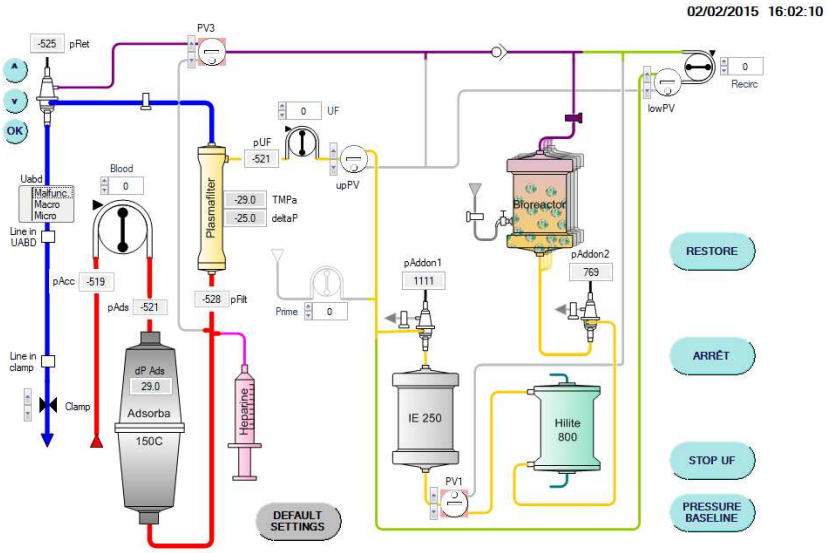


Figure 173: Capture d'écran du traitement

Les pressions du système sont initialement sauvegardées comme pressions de références pour la gestion des alarmes. Les pressions de références peuvent être mises à jour à tout moment par le bouton « Pressure Baseline ». Les débits peuvent aussi être changés en cours du traitement. Lorsqu'une alarme se déclenche et arrête les pompes, les débits sont sauvegardés et peuvent être restaurés grâce au bouton « Restore ». Si un problème survient, il est possible d'appuyer à tout moment sur le bouton « Stop UF » pour arrêter la plasmafiltration. Le patient est isolé des bioréacteurs. Le débit de la pompe de recirculation est majoré de la valeur de la pompe d'ultrafiltration pour compenser l'arrêt de cette dernière et ainsi garder le débit dans les bioréacteurs inchangé. Pour revenir au traitement classique, il faut appuyer à nouveau sur le bouton « Stop UF ». Le bouton « Default Setting » permet de réinitialiser la thérapie. Le bouton « Arrêt » permet d'arrêter totalement la thérapie (cf. figure 173).

Les alarmes dans une thérapie Prismaflex classique sont priorisées de la manière suivante:

- Malfunction : tout s'arrête à cause d'un problème technique (écran rouge)
- Warning : tout s'arrête (écran rouge)
- Caution : la pompe sang continue de tourner (écran orange)
- Advisory : tout continuent de fonctionner normalement (onglet jaune)

Parmi ces alarmes certaines vont être intéressantes à utiliser dans le cadre de la thérapie SUPPLIVER (cf. figure 174 et 175).

Alarm Priority List

Priority	Alarm Title
Malfunctions (High Priority)	
1	General System Failure
2	Communication Error
3	Memory Error
4	Pressures Circuit Board
5	Voltage Out of Range
Warnings	
6	Air in Blood
7	Return Disconnection
8	Return Pressure Dropping
9	Set Disconnection
10	Filter Clotted
11	Plasmafilter Clotted
12	HP Cartridge Clotted
13	Blood Leak Detected
14	Access Extremely Negative
15	Return Extremely Positive
16	Access Extremely Positive
17	Filter Extremely Positive
18	Power Failure
19	Wrong Set Loaded
20	Effluent Bag Full
21	Bag/Container Empty
22	Bag Volume Incorrect
23	Effluent Bag Incorrect
24	Scale Open
25	Clamped Lines
26	Syringe Line Clamped
27	Syringe Empty
28	Calcium Syringe Empty
29	Calcium Line Clamped
30	Ca Line Not Connected
31	Recirculation Time Exceeded
32	Effluent Bag Full
33	Set-up Error
34	Wrong Set Selected
35	Crossed Lines
36	Clamped Lines
37	Wrong Set Loaded
38	Loading Error
39	Battery Low
40	Unsuitable Ca Solution
41	Effluent Line Not in BLD
42	Air Detector
43	Clamp Stuck Closed
44	Blood Pump
45	Effluent Pump
46	Replacement Pump
47	Dialysate Pump
48	Replacement 2 Pump
49	PBP Pump
50	Normalization Failed
51	Blood Leak Detector
52	Self-Test Failure
53	Prime Self-Test
54	Syringe Pump
55	Scales
56	Pressure Zero Test
57	Scale Zero Test
58	Checksum Interrupted
59	Custom Data
60	Library Data
61	Cannot Save Custom Data
62	Memory Error
63	Upper Pinch Valve
64	Lower Pinch Valve
65	Scales Circuit Board
66	Effluent Scale Sensor
67	Replacement Scale Sensor
68	Dialysate Scale Sensor
69	PBP Scale Sensor
70	Syringe Not Loaded / Ca Syringe Not Loaded
71	Line in Air Detector
72	Line in Clamp
73	No Line in Air Detector
74	No Line in Clamp
75	Memory Error, code 7
76	Auto Blood Return

Figure 174: Liste des alarmes de type « Malfunction » et "Warning" des spécifications Prismaflex (Les alarmes intéressantes dans le cadre de la thérapie SUPPLIVER sont encadrées)

Caution	
77	Loss Limit Reached/Gain Limit Reached
78	Unresolved Flow Problems
79	Flow Problem
80	TPE Prescription Delivered
81	Effluent Bag Full
82	Bag Empty
83	TMP Excessive
84	TMPa Excessive
85	Bag Volume Incorrect
86	Effluent Bag Incorrect
87	Scale Open
88	Patient Fluid Gain Excessive
89	Anticoagulation Suspended

Advisory	
90	Check Access
91	Check Return
92	Blood Flow Stopped
93	Syringe not loaded / Ca Syringe Not Loaded
94	Fluid Pumps Stopped
95	Check Syringe Line
96	Syringe Empty
97	Syringe Line Clamped
98	Calcium Syringe Empty
99	Syringe Almost Empty / Ca Syringe Almost Empty
100	Calcium Line Clamped
101	Ca Line Not Connected
102	Filter is Clotting
103	Plasmafilter is Clotting
104	HP Cartridge is Clotting
105	TMP Too High
106	TMPa Too High
107	Time to Change Set
108	Cannot Detect Return
109	Download Interrupted
110	Anticoagulation Checkpoints
111	Self-Test Overdue
112	Memory Backup
113	MARS Treatment
114	Battery Exhausted
115	Main Power Lost
116	Incomplete Bolus

Figure 175: Liste des alarmes de type "Caution"(à droite) et "Advisory" (à gauche) des spécifications Prismaflex (Les alarmes intéressantes dans le cadre de la thérapie SUPPLIVER sont encadrées)

Plus particulièrement pour la thérapie SUPPLIVER les alarmes ont été définies de la manière suivante à partir des alarmes Prismaflex:

6: Air dans le sang: signal UABD = 0

11: Plasmafiltre obstrué: ΔP plasmafiltre max > 100mmHg

12: Cartouche d'hémoperfusion obstrué: ΔP Adsorba max > 150mmHg

13: Fuite de sang: signal BLD < 22500

14: Pression accès extrêmement négative: $P_{accès}$ < -250mmHg

15: Pression retour extrêmement positive: P_{retour}>300mmHg

16: Pression accès extrêmement positive: $P_{accès}$ > 350mmHg

17: Pression filtre extrêmement positive: P_{filtre}> 450mmHg

50: Echec de la normalisation: 42000 > Signal Normalisation BLD > 45000

53: Test occlusivité: P_{max}=300mmHg / Seuil=15mmHg / Durée=25sec / Débit=100ml/min

73: Ligne dans le clamp: signal UABD = 2

74: Pas de ligne dans le détecteur d'air: signal UABD >1

84 : TMP_a excessive: TMP_a max >150mmHg (pression filtre-pression effluent)

90 : Vérifier l'accès: Augmentation de la pression accès de plus de 50mmHg par rapport à la pression initiale

91 : Vérifier le retour: Augmentation de la pression retour de plus de 50mmHg par rapport à la pression initiale

94 : Plasmafiltration arrêtée

103 : Le plasmafiltre est en train de s'obstruer : Augmentation de la ΔP du plasmafiltre de plus de 60mmHg par rapport à la ΔP initiale

104 : La cartouche d'hémofiltration est en train de s'obstruer : Augmentation de la ΔP de l'Adsorba plus de 30mmHg par rapport à la ΔP initiale

106 : TMP_a trop haute : TMP_a limite > 100mmHg ((pression filtre-pression effluent)

Finalement les alarmes du BLD (n° 13 et 50) n'ont pas été jugée importante pour de premiers essais précliniques puisque une fuite de sang est visible à l'œil nu. De même pour l'alarme concernant la détection de la ligne dans le détecteur d'air (n°73).

D'autres alarmes ont été définies pour l'Add-On :

Cartouche IE250 ou Hilite 800 obstrué: Pression Add-On1 > 250mmHg

Bioréacteurs ou filtre à particules obstrué : Pression Add-On2 > 250mmHg

Dégazage du Hilite 800 : Pression Add-On2 <10mmHg

Les priorités des alarmes sont un peu différentes de celles des thérapies actuelles de Prismaflex. Il y a en fait trois niveaux de « warning » :

- Warning 1 : Arrêt de toutes les pompes du circuit (arrêt de la fluidisation).
- Warning 2 : Le niveau est identique au niveau « Warning 1 » mais avec des instructions spécifiques du fait que l'alarme soit lié à l'UABD. La pompe de recirculation est ensuite remise en fonctionnement.
- Warning 3 : Arrêt des pompes de sang et d'ultrafiltration avec maintien de la fluidisation grâce à la pompe de recirculation.

Dans X-Lab un onglet « Alarms » permet de coder ses alarmes. Lorsqu'une condition est validée et qu'une alarme se déclenche, il y a sauvegarde automatique de l'état du système (débit des pompes, positionnement des vannes…) puis, selon la qualité de l'alarme (Warnings, Caution ou Advisory) et sa cause, différents programmes se déclenchent (arrêt de la pompe sang / arrêt de toutes les pompes), un bandeau s'affiche et une sonnerie retentie.

A droite de l'écran un affichage récapitule l'historique des alarmes qui se sont déjà déclenchées. Un bouton permet d'effacer toutes les alarmes (« Clear History »). Deux boutons sur la barre d'outils permettent de faire taire l'alarme (haut-parleur barré) ou de réactualiser la surveillance (flèche bleue) (cf. figure 176).

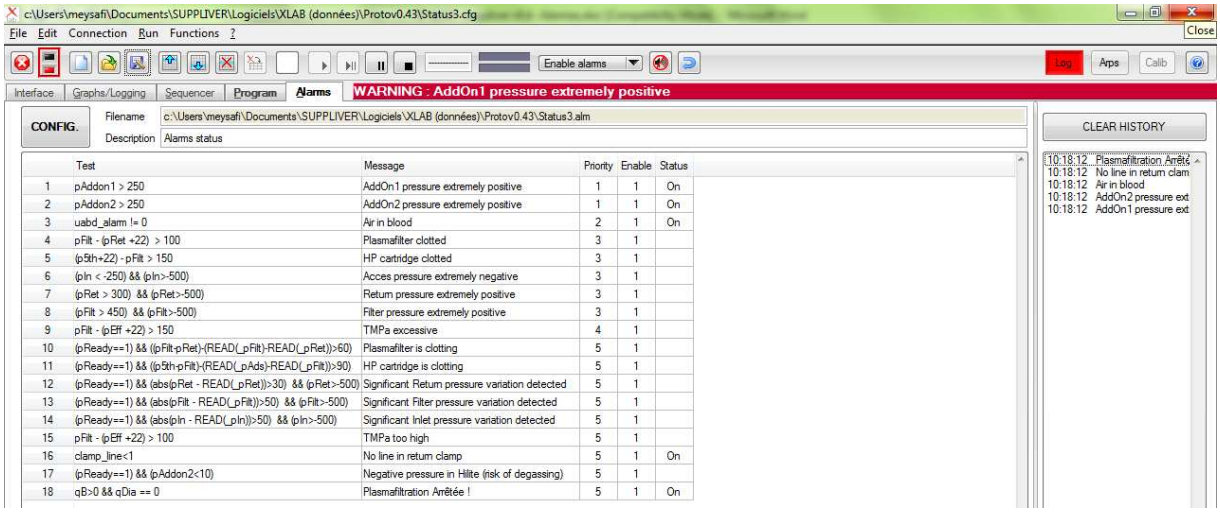


Figure 176: Capture d'écran de la séquence d'alarmes du traitement SUPPLIVER

Quelques alarmes peuvent aussi se déclencher pendant le priming et pendant la restitution (cf. figures 177 et 178).

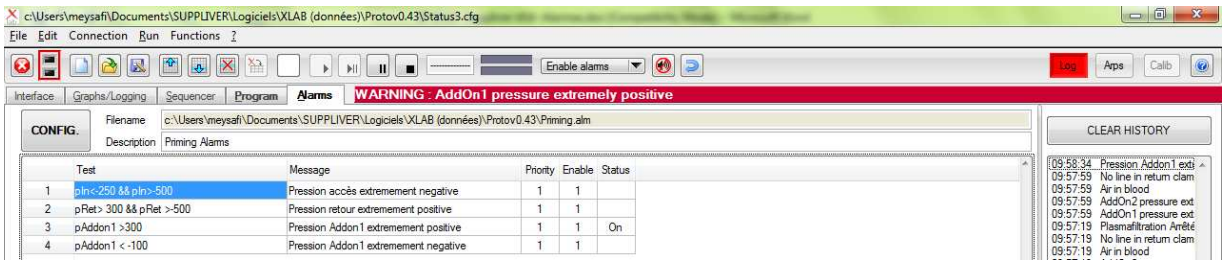


Figure 177: Capture d'écran de la séquence d'alarmes du priming SUPPLIVER

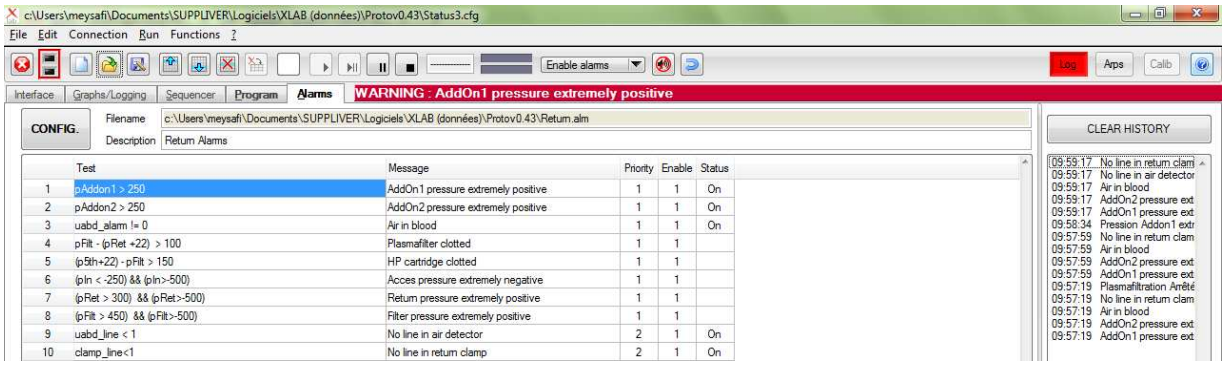


Figure 178: Capture d'écran de la séquence d'alarmes de la restitution d la thérapie SUPPLIVER

Les difficultés de la gestion d'alarmes résident dans le fait de prioriser les alarmes. En effet, le déclanchement d'une alarme « Caution » ne doit pas inhiber le déclenchement d'une alarme « Warning ». Inversement, une alarme « Warning » doit être prioritaire, si son déclenchement fait suite au déclenchement d'une alarme « Caution ». Le système d'alarme a été vérifié en préalable aux essais précliniques (cf. VI.1)

IV.2.1.6 Arrêt du traitement

L'arrêt de la thérapie doit être confirmé dans l'écran d'arrêt. Cependant la reprise du traitement peut se faire en appuyant, dans l'écran d'arrêt, sur le bouton « Reprise ». L'arrêt du traitement est confirmé en appuyant sur « Fin Traitement ». Les pompes s'arrêtent, le patient est alors débranché et le set est retiré sans restitution. Un écran apparait pour enchainer sur un nouveau traitement.

Si une restitution est prescrite, il est possible, en appuyant sur « Restitution » dans l'écran d'arrêt, de contrôler les débits de sang et de plasma réinjectés.

Certaines possibilités du circuit ne sont pas décrites en amont. Il existe, pour faire des dosages, des sites de prélèvement situés en entrée et sortie du circuit sanguin et en entrée et sortie des bioréacteurs. La pompe de priming peut servir à l'introduction de solutions, par exemple de glucose, mais il n'y a pas de sortie possible au niveau de la circulation extracorporelle qui fonctionne en boucle fermée. Certaines fonctionnalités auraient pu être souhaitables mais n'ont pas été réalisées. Par exemple, un remplissage séquentiel permettant de choisir d'introduire une, deux, trois ou quatre poches de billes aurait pu être intéressant à concevoir. De même, il aurait été avantageux de pouvoir adapter l'introduction des billes à un volume différent pour chaque thérapie.

Certaines étapes de la thérapie seront sans doute à modifier en fonction des résultats apportés par les tests de validation (cf. chapitre V).

IV.3 CONCLUSION

Une circulation extracorporelle complète a été conçue et réalisée avec succès. Elle a nécessité de nombreuses réflexions pour se projeter sur le traitement global final, et a donc fait l'objet, au cours des deux premières années, de nombreux ajustements amenant à des versions évolutives. Destinée, dans sa version actuelle, à des patients de faible poids et aux essais précliniques chez le gros animal, elle est cependant facilement adaptable pour une taille adulte. Le pilotage de cette circulation extracorporelle se fait de manière simple et sûre grâce à la création d'une thérapie et d'alarmes par l'intermédiaire du logiciel X-Lab. Les résultats de conception de la circulation extracorporelle ont été publiés dans la revue IRBM.

Le cahier des charges initialement fixé a été respecté et des solutions ont été apportées pour assurer la conception de cette circulation extracorporelle. Chaque élément du circuit permet de répondre à une ou plusieurs problématiques. La recirculation notamment permet de remplir divers besoins (perfusion du bioréacteur, maximisation du nombre de cellules,…) (cf. tableau 17).

Tableau 17: Tableau récapitulatif des problématiques résolues grâce aux divers éléments du circuit

	Perfusion du bioréacteur	Introduction des billes	Maximisation du nombre de cellules	Maintien d'une température de 37°C au sein des bioréacteurs	Maintien d'une oxygénation importante et continue	Diminution des concentrations de toxines en contact avec les cellules	Sécurité du patient
Une boucle de recirculation	*	*	* (augmentation du débit possible de perfusion)	*	*	* (indirectement)	*
Quatre bioréacteurs en parallèle			*	*			
Un oxygénateur / réchauffeur				*	*		*
Une cartouche échangeuse d'ions						*	* (efficacité thérapeutique)
Une cartouche de charbon actif						*	* (efficacité thérapeutique)
Un filtre à particules							*

Une oxygénation très importante des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés semblent bénéfique du point de vue métabolique. Des interrogations subsistent sur les capacités de l'oxygénateur mis en place. Il conviendrait donc de répéter des manipulations d'oxygénation de cellules avec une oxygénation faible (en saturant l'atmosphère au-dessus du réservoir sans agitation) pour analyser si l'oxygénateur peut réellement être un atout pour l'amélioration des activités métaboliques des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés.

Le Hilite 800 a de toute manière sa place dans le circuit en tant que réchauffeur garantissant une température de 37°C au sein des bioréacteurs

Des dispositifs artificiels de détoxication (charbon actif et cartouche échangeuse d'ions) ont été ajoutés au circuit dans le but d'assurer un meilleur environnement aux cellules. La détoxification de l'ammoniac par l'Adsorba est importante mais la cartouche est très vite saturée. Un effet bénéfique de la réduction du taux d'ammoniac par l'Adsorba est observé sur des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés. Mais c'est la recirculation qui finalement va surement permettre de protéger les cellules de très fortes concentrations de toxines à cause de la dilution initiale produite.

Concernant les risques de fuite de particules, il conviendrait de trouver un filtre plus adapté et compact pour bloquer les éventuels débris de billes et de cellules échappées des bioréacteurs. Le détecteur de fuites de sang est capable de détecter une fuite de billes contenant des microparticules de verre. La détection est cependant trop peu sensible pour permettre d'assurer une réelle sécurité du patient. Il faudrait plutôt se concentrer sur une maitrise de la fluidisation en adaptant par exemple les prescriptions de débit de fluidisation directement par rapport au taux protéique du patient. Pour cela il conviendrait de bien caractériser la fluidisation à grande échelle en faisant plus d'expérimentations. Le développement d'un détecteur avertissant du dépassement d'une hauteur de lit maximale serait une solution prioritaire à explorer. Il est envisageable d'avoir un système d'ajustement automatique du débit en fonction du niveau qui permettrait de gérer les variations de concentration de plasma et de température.

La circulation extracorporelle conçue à partir du cahier des charges initial a été validée par des essais *in vivo* et *in vitro* à grande échelle. Les résultats de ces essais sont présentés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE V : **TESTS DE VALIDATION**

V.1 ESSAIS *IN VITRO* AVEC DU SANG BOVIN

Des essais avec du sang bovin ont été réalisés en amont des essais précliniques pour tester en laboratoire la thérapie telle qu'elle allait être expérimentée chez l'animal. Le fonctionnement de la thérapie ainsi que la gestion des alarmes étant complexes, ces essais impliquant le circuit complet sans cellules ont été jugés nécessaires pour éviter de rencontrer certains problèmes directement lors des essais *in vivo*.

V.1.1 Conditions initiales

Les billes fabriquées pour l'essai (200ml) étaient homogènes et mesuraient environ 1 mm de diamètre. Elles contenaient 1,25g de microparticules de verre par ml d'alginate. Les trois litres de sang utilisés pour l'essai avaient une concentration de protéines totales de 50g/L et un taux d'hématocrite de 43%. Du plasma a été utilisé pour le priming. Sa concentration en protéines totales était de 34g/L. Ce plasma était en partie hémolysé mais il n'y a pas eu de mesure optique de faite pour juger du taux d'hémolyse.

V.1.2 Conditions post priming

Un premier essai avec le sang bovin, a montré l'impossibilité d'utiliser la cartouche IE250 sur un circuit plasmatique pour cause de coagulation sévère du plasma (cf. figure 179). Cet évènement n'était pas prévu, mais a mis en évidence que cette cartouche, utilisée en clinique sur le circuit secondaire du système MARS avec une solution d'albumine, n'est pas directement adaptable au plasma dont la composition est plus complexe (fibrinogène, facteurs de coagulation, …).

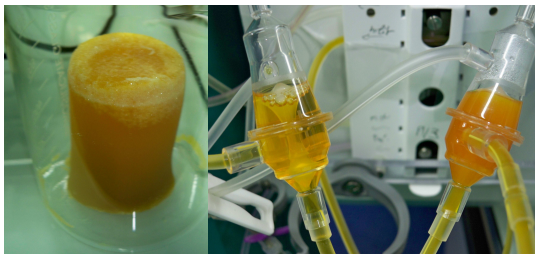


Figure 179: A gauche: Démoulage de la cartouche IE250. A droite : Pièges à bulles en amont et en aval de la cartouche IE250 (le piège à bulle en aval contient du plasma qui totalement figé).

Lors de la phase d'introduction des billes d'un second essai, la nécessité d'ajouter une étape d'homogénéisation avant l'introduction des billes a été confirmée par l'observation d'un front de plasma à l'intérieur des cartouches lors du priming au plasma (cf. figure 180). La concentration de protéines totales du plasma du circuit plasmatique (après le priming au plasma) a été mesurée à 21g/L (correspondant à une masse volumique de 1002 kg.m-^{3} à 37°C). Le débit de recirculation a été de 6000ml/h soit 25ml/min par bioréacteur. La hauteur des lits se situaient entre 3 et 3,3cm (soit une porosité d'environ 0,6 pour un volume de 50 ml de billes en lit tassé).

Figure 180: A gauche: non homogénéisation du plasma lors du priming. A droite: Fluidisation après introduction des billes.

V.1.3 Observations en phase de traitement

La concentration en protéines totales du sang après 20 minutes de thérapie était de 44 g/L (soit une masse volumique d'environ 1010 kg.m-^{3} à 37°C). L'hématocrite post priming était de 37%. Une hémodilution dans les proportions attendues a donc été observée. Malgré une hausse de la concentration de protéines totales du plasma, la fluidisation est restée à une porosité d'environ 0,6 avec une hauteur des lits entre 3 et 3,5cm. L'expansion est importante peut-être à cause d'une température basse dans les bioréacteurs (la température au sein du circuit n'a pas été contrôlée). La fluidisation est homogène dans les quatre cartouches (cf. figure 181).

Figure 181: Phase de traitement lors de l'essai avec du sang bovin

En ce qui concerne le monitorage des pressions, la TMPa était haute (80mmHg) à 1 heure de traitement générant une alarme (TMPa excessive). Cette alarme est normalement déclenchée pour prévenir un évènement d'hémolyse.

Les conditions de fraction filtrée était pourtant faible (16%) avec un débit d'ultrafiltration de 2000ml/sec (environ 33 ml/min) pour un débit sang de 200mL/min (cf. figure 182). L'augmentation de TMPa observée assez fréquemment lors d'essais de plasmafiltration est plutôt consécutive aux conditions d'anticoagulation.

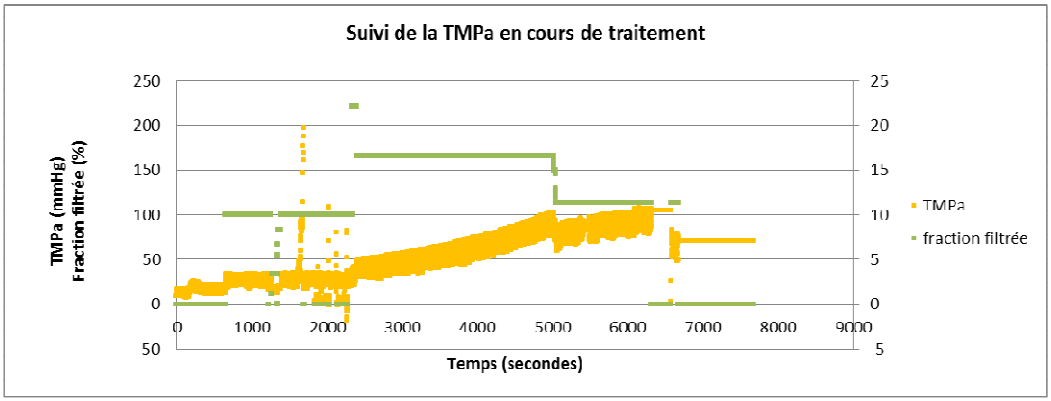


Figure 182: Suivi de la TMPa au cours du traitement (données recueillies via le logiciel X-Lab)

Les alarmes ont été tétées et ont bien fonctionnées.

La restitution du sang s'est déroulée sans problèmes mais il n'y a pas eu de suivi hémodynamique réalisé dans le réservoir après la restitution.

Le déroulement de cet essai a donc permis de valider nos hypothèses de fonctionnement et le déroulé du traitement, d'attirer notre attention sur les problèmes potentiels de coagulation, et d'éliminer l'usage de la cartouche IE250 pour les essais ultérieurs.

V.2 ESSAIS PRECLINIQUES SUR MODELE OVIN

Les essais précliniques prévus dans le cadre du projet SUPPLIVER devaient à l'origine s'effectuer sur un modèle porcin en insuffisance hépatique. La circulation extracorporelle complète devait alors être testée (bioréacteurs remplis de cellules). Il a été finalement décidé de procéder d'abord à des essais sur modèle ovin pour valider la sécurité du traitement.

Un protocole impliquant des traitements Suppliver (sans la présence de cellules) sur des ovins, de l'école vétérinaire Vet'Agro Sup de Marcy l'étoile, a été défini avec l'opportunité de générer des données préliminaires de monitorage (cf. II.4.3). Ces données seront utiles pour décider de la pertinence ou non d'inclure au traitement un remplissage du circuit avec un équivalent au plasma en plus d'un amorçage avec une solution sérum physiologique. Deux moutons ont été testés sur deux jours non consécutifs (cf. figure 183).

Figure 183 : Traitement du jour 3 sur le mouton A avec un priming au sérum physiologique

V.2.1 Déroulement des essais

Quatre essais ont été réalisés au total : deux sur le mouton A et deux sur le mouton B. Pour chaque animal, le traitement était identique en dehors du remplissage du circuit secondaire (un avec du sérum physiologique et un avec du plasma autologue).

Il faut noter que pour ces essais, les bioréacteurs n'ont donc pas pu être remplis avec 125ml, comme le prévoit normalement la thérapie, mais seulement avec 50ml de billes chacun, du fait de difficultés techniques rencontrées lors de leur production (cf. V.2.4).

V.2.1.1 Jour 1 / Mouton A / Priming au sérum physiologique

Ce premier essai a permis de mettre en évidence certains écueils liés à la coagulation, qui est toujours assez difficile à gérer sur ce modèle animal. Le démarrage de l'essai a été pénalisé par plusieurs coupures de courant dues à l'alimentation du bain thermostaté lors du branchement de l'animal, qui ont mené à une coagulation rapide du filtre. De plus, l'anticoagulation n'avait pas été réalisée selon les spécifications des instructions d'utilisation des dispositifs (poches de priming non héparinées). Des difficultés à restituer le plasma ont également été observées. Les deux phases, liquide physiologique et plasma, se mélangeant peu, le liquide physiologique passe par un chemin préférentiel au travers du plasma du fait de sa masse volumique plus faible (la restitution se fait en effet du bas vers le haut des cartouches pour éviter un écrasement des billes contre le tamis).

V.2.1.2 Jour 2 / Mouton B / Priming au plasma

Lors de cet essai, de nouveaux problèmes techniques sont apparus lors de la phase de remplissage des bioréacteurs (robinets des bioréacteurs cassés, introduction d'air dans le circuit…). Un des robinets a dû être colmaté par de la colle néoprène. Ce colmatage n'as pas tenu et le bioréacteur a été clampé une heure après traitement pour cause de fuite. Le débit de recirculation a alors été adapté (2250 au lieu de 3500 ml/h).

En dehors de ces retards dans la phase d'amorçage, le traitement s'est très bien déroulé : il n'y a eu que deux arrêts durant la thérapie.

En particulier, l'anticoagulation des poches de priming a été correctement mise en place (500UI/L) et l'anticoagulation systémique a été modifiée pour une infusion au niveau de l'accès du circuit extracorporel par l'intermédiaire d'un pousse seringue (500UI/ml). Le débit initial du pousse seringue a été réglé à 10ml/h puis modifié si besoin en fonction du temps de céphaline (TCA) mesuré.

V.2.1.3 Jour 3 / Mouton A / Priming au plasma

Cet essai s'est parfaitement déroulé, que ce soit au niveau du priming ou au niveau du traitement lui-même. La stratégie d'anticoagulation est restée la même que pour le jour précédent. Seuls quelques arrêts ont été déclenchés à cause de déplacements du cathéter au niveau de l'accès vasculaire.

V.2.1.4 Jour 4 / Mouton B / Priming au sérum physiologique

Le priming de cet essai s'est très bien déroulé. Un problème technique de positionnement du capteur de pression, au niveau de l'oreille de l'animal, a rendu impossible la mesure de la pression artérielle moyenne.

A nouveau, le positionnement difficile du cathéter au niveau de l'accès vasculaire a entrainé des arrêts de traitement assez nombreux. Un problème de coagulation du filtre est apparu. Pour la restitution du plasma, le débit a été augmenté (100ml/min) pour essayer de casser le chemin préférentiel du liquide physiologique et ainsi mieux mixer les deux phases.

Les évènements importants qui se sont déroulés au cours des quatre jours d'essais sont résumés dans le tableau ci-dessous (cf. tableau 18).

Tableau 18: Récapitulatif des évènements marquants des quatre traitements effectués sur les moutons

	Jour 1 Mouton A Sérum physiologique	Jour 2 Mouton B Plasma	Jour 3 Mouton A Plasma	Jour 4 Mouton B Sérum physiologique
Priming	-	Robinets des bioréacteurs cassés Introduction d'air dans le circuit	-	-
Anticoagulation	Pas d'héparine dans les poches de priming Bolus d'héparine en fonction du TCA	Poches de priming héparinées Infusion d'héparine en continue en fonction du TCA	Poches de priming héparinées Infusion d'héparine en continue en fonction du TCA	Poches de priming héparinées Infusion d'héparine en continue en fonction du TCA
Traitement	Coupures de courant au branchement Coagulation du filtre au bout de 1h30	Clampage d'un des bioréacteurs dont le robinet était cassé	Arrêts dû aux déplacements du cathéter	Arrêts dû aux déplacements du cathéter Coagulation du filtre au bout de 3h de traitement
Restitution	Difficultés de restitution du plasma	-	-	Augmentation du débit de restitution du plasma

V.2.2 Suivi hémodynamique

V.2.2.1 Pression artérielle moyenne

La pression artérielle moyenne était stable quelque soit le traitement (cf. figure 184 à 186). Le quatrième jour, la pression n'a pas pu être monitorée car le capteur n'a pas pu être plaçé correctement sur l'animal.

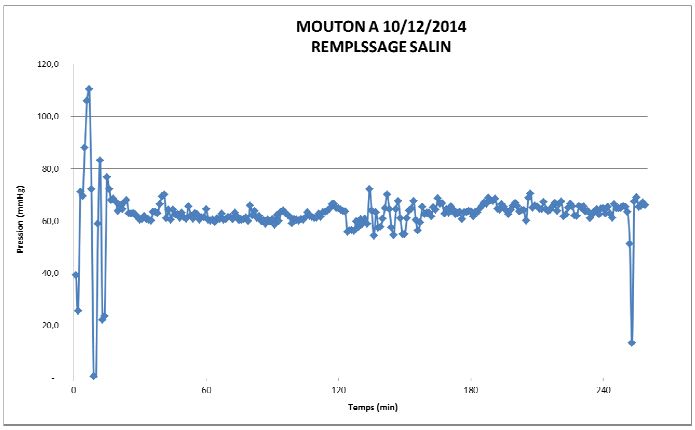


Figure 184: Mesure de la pression artérielle moyenne le jour 1 chez le mouton A avec un priming au sérum physiologique

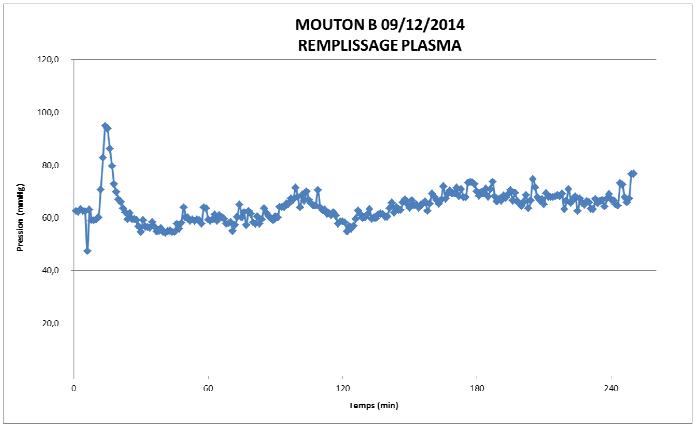


Figure 185: Mesure de la pression artérielle moyenne le jour 2 chez le mouton B avec un priming au plasma

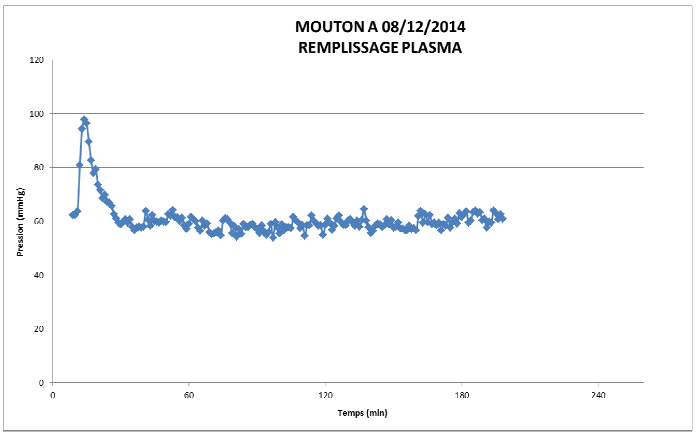


Figure 186: Mesure de la pression artérielle moyenne le jour 3 chez le mouton A avec un priming au plasma

V.2.2.2 Paramètres de surveillance

Dans l'ensemble des essais, la perte de charge dans le plasmafiltre (ΔP filtre) et la pression transmembranaire (TMPa) sont surveillées. Si la perte de charge augmente, on peut suspecter une situation de coagulation du sang dans les capillaires, qui en bouche certains et génère donc une résistance additionnelle à l'écoulement tangentiel. Si la pression transmembranaire augmente, c'est plutôt un phénomène de colmatage des pores de la membrane qui est mis en évidence.

Des coupures de courant, survenues au cours de l'essai du premier jour, ont surement provoqué un début de coagulation dès le début du traitement (ΔP filtre = 100mmHg). La perte de charge élevée du filtre a provoqué rapidement des alarmes de coagulation (au bout de moins d'une heure de traitement). Puis une coagulation plus sévère est apparue. Cette coagulation a conduit à un arrêt du traitement après 2 heures et demie au lieu des 4 heures prévues (cf. figure 187). L'anticoagulation avait été mal gérée.

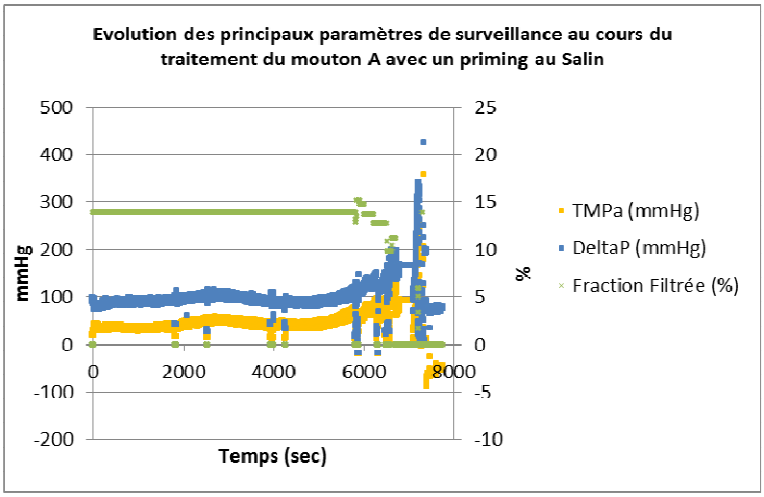


Figure 187: Evolution des principaux paramètres de surveillance au cours du traitement du mouton A avec un priming au sérum physiologique

Pour les deux essais des jours suivants (priming au plasma), aucun problème de coagulation ne s'est produit (cf. figure 188 et 189), et les valeurs de perte de charges restent plutôt stables. On observe donc bien le bénéfice de l'anticoagulation des poches de priming et de la modification de l'anticoagulation systémique (infusion d'héparine en continu).

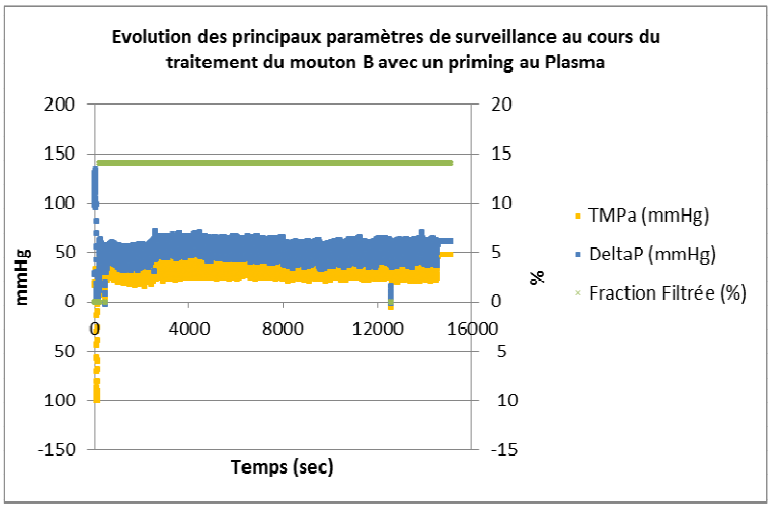


Figure 188: Evolution des principaux paramètres de surveillance au cours du traitement du mouton B avec un priming au plasma

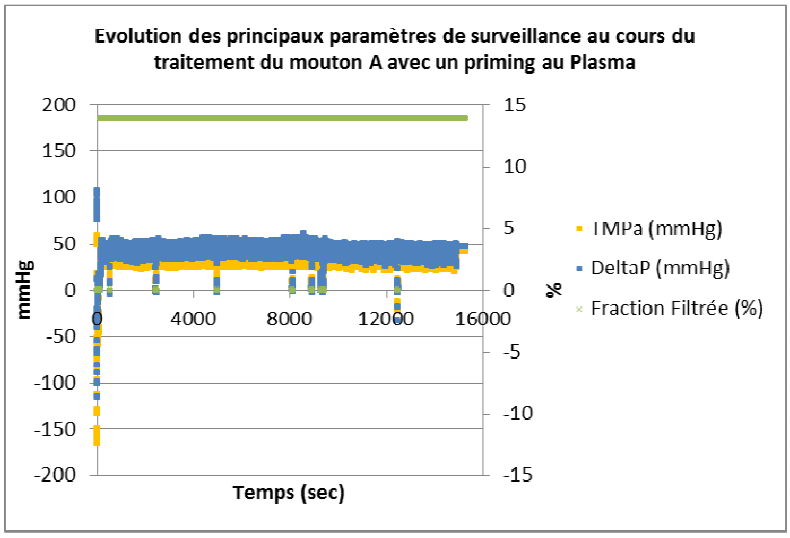


Figure 189: Evolution des principaux paramètres de surveillance au cours du traitement du mouton A avec un priming au plasma

Au cours de l'essai du 4ème jour, un probléme de coagulation est apparu progressivement malgré une anticoagulation quasiment inchangée par rapport aux essais précédents. Après 3h de traitement la coagulation a empêché le bon dérulement de l'essai (cf. figure 190). Plusieurs problèmes de déplacement du cathéter au niveau de l'accés ont conduit a des arrêts assez fréquents pouvant peut être expliquer cette coagulation.

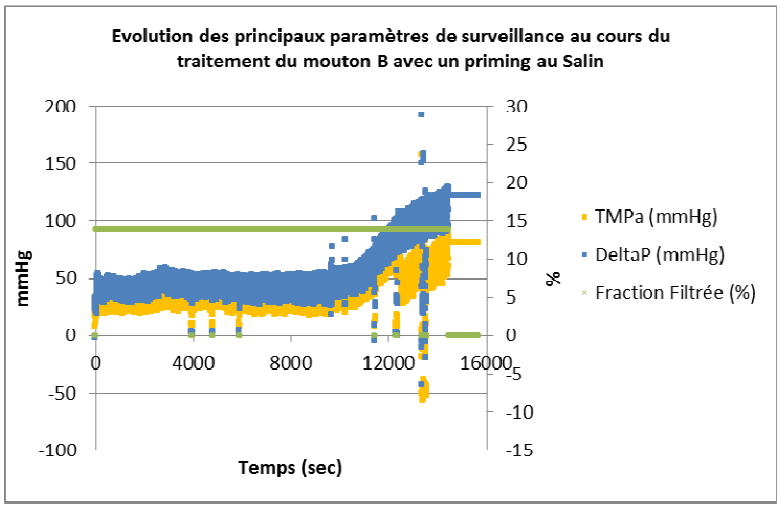


Figure 190: Evolution des principaux paramètres de surveillance au cours du traitement du mouton B avec un priming au sérum physiologique

Des problèmes de coagulation sont survenus seulement lors des deux remplissage avec du sérum physiologique. Le priming de la partie sanguine du circuit se faisant de la même manière lors des deux priming (plasma ou sérum physiologique), il semble peu probable de la coagulation du filtre soit dépendante d'un priming au sérum physiologique de la partie plasmatique du circuit.

V.2.3 Hémodilution

La problématique de l'hémodilution est centrale dans le traitement SUPPLIVER car le volume du circuit extracorporel est bien supérieur à celui d'un traitement par plasmaphérèse classique. Deux paramètres apparaissent essentiels à surveiller : la concentration plasmatique en protéines totales, cette concentration étant notamment associée à la pression oncotique sanguine, et l'hématocrite

V.2.3.1.1 Protéines totales

Les évolutions des concentrations en protéines totales du circuit et de l'animal sont présentées dans les figures ci-dessous (cf. figure 191 à 194).

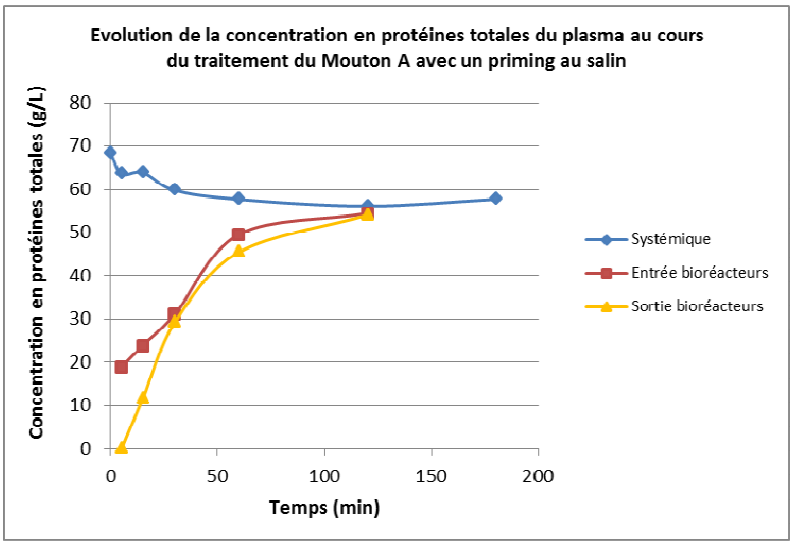


Figure 191: Evolution de la concentration en protéines totales du plasma au cours du traitement du mouton A avec un priming au sérum physiologique

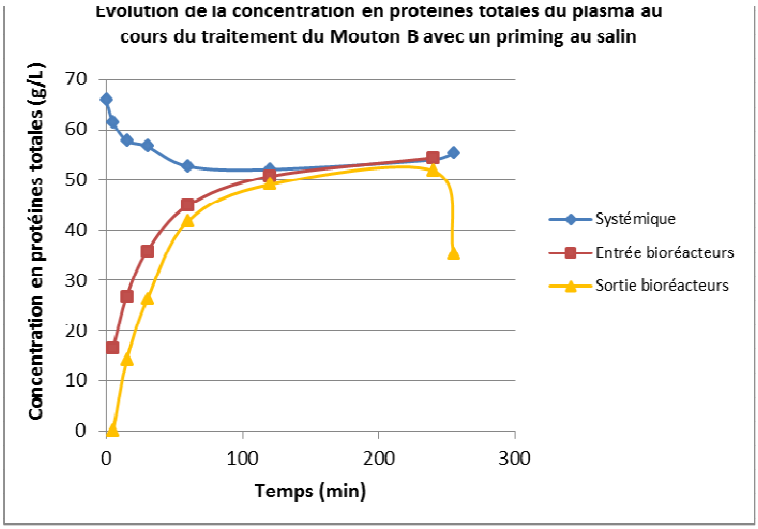


Figure 192: Evolution de la concentration en protéines totales du plasma au cours du traitement du mouton B avec un priming au sérum physiologique

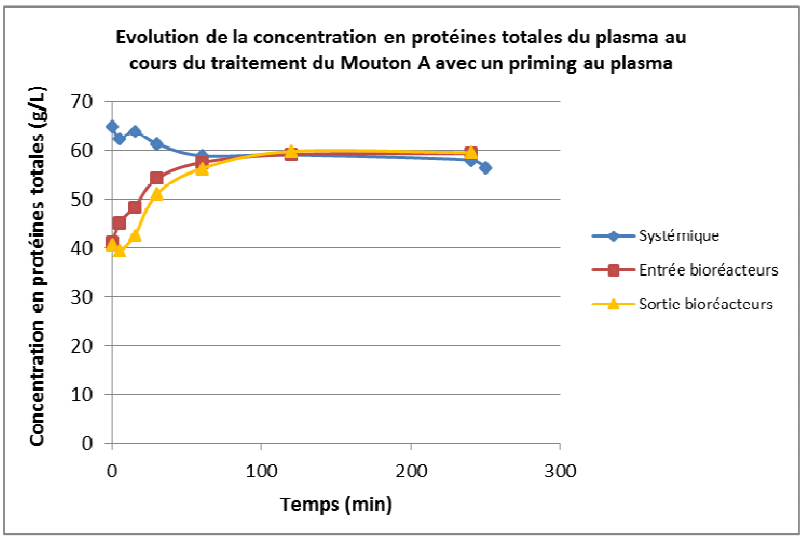


Figure 193: Evolution de la concentration en protéines totales du plasma au cours du traitement du mouton A avec un priming au plasma

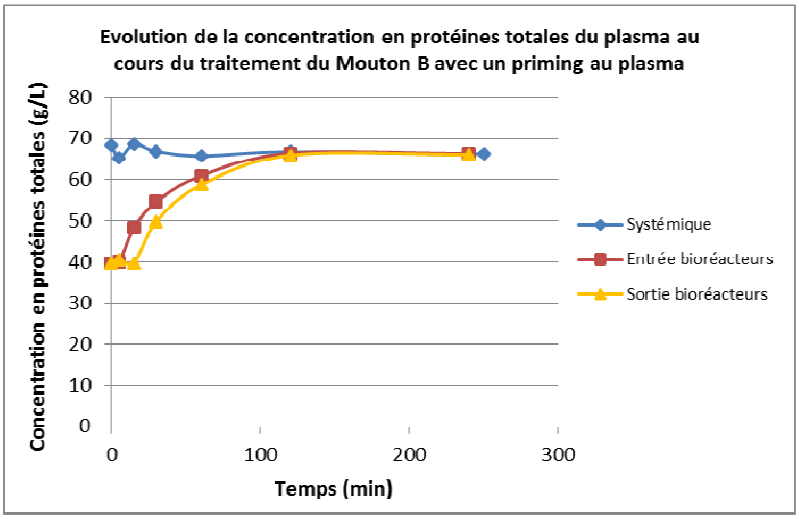


Figure 194: Evolution de la concentration en protéines totales du plasma au cours du traitement du mouton B avec un priming au plasma

Pour comparer les deux méthodes de remplissage des indicateurs sont utilisés : le temps d'homogénéisation et le taux d'hémodilution. Le temps d'homogénéisation correspond au temps pour lequel les concentrations de protéines de l'animal et du circuit sont égales. L'équilibre est atteint au temps d'homogénéisation. Le taux d'hémodilution correspond à la différence, entre la concentration initiale de protéines et la concentration de protéines à l'équilibre ou après restitution de l'animal, divisée par la concentration initiale de protéines de l'animal. Il est exprimé en pourcentage.

L'hémodilution est beaucoup plus importante avec un priming au sérum physiologique (20% contre 5% avec un priming au plasma). Une hémodilution de 20% est attendue dans le cas du priming au sérum physiologique puisque on dilue environ 1,5L dans 7L de sang. Le temps moyen d'homogénéisation est d'environ 2h ce qui est cohérent par rapport au débit d'ultrafiltration (à 25ml/min il faut 2h pour faire deux circulations du fluide dans la partie plasmatique (cf. figure 195).

La restitution du sang seule a tendance à faire augmenter le taux d'hémodilution lors d'un traitement avec un priming au plasma (plus de 2% d'augmentation). Cela peut s'expliquer par le fait que beaucoup trop de liquide physiologique aurait été infusé lors de la restitution du sang. Ceci pourrait en partie justifier la non-efficacité de la restitution du plasma lors des traitements avec un priming au sérum physiologique.) (cf. figure 195).

La restitution du plasma, dans le cas d'un priming au sérum physiologique, a peu d'effet (cf. figure 195). Elle semble quand même plus efficace pour le deuxième traitement au jour 4 avec un priming au sérum physiologique, où le débit de restitution avait été augmenté, avec une diminution de plus de 5% de l'hémodilution contre seulement 1% pour le précédent traitement avec priming au plasma. (cf. figure 196).

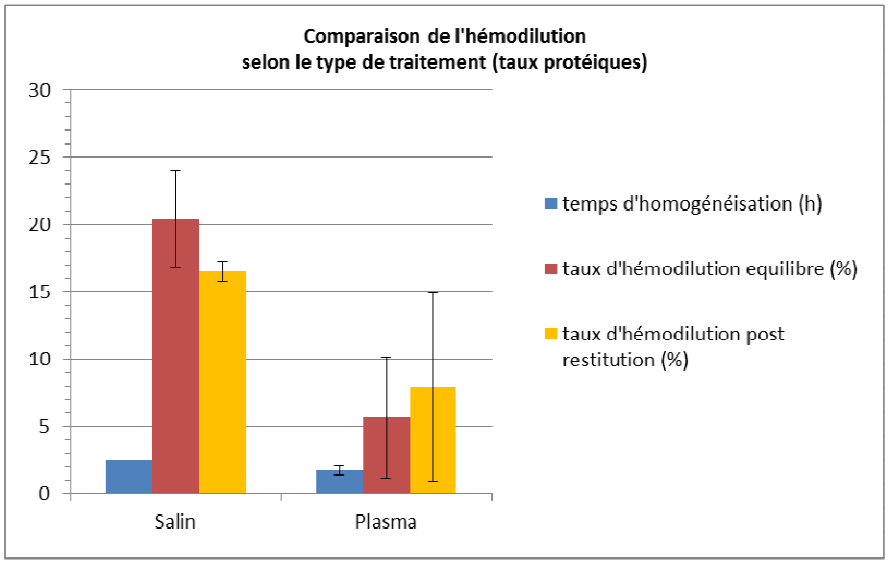


Figure 195: Comparaison des données l'hémodilution (protéines totales) des traitements avec un priming au sérum physiologique par rapport aux traitements avec un priming au plasma

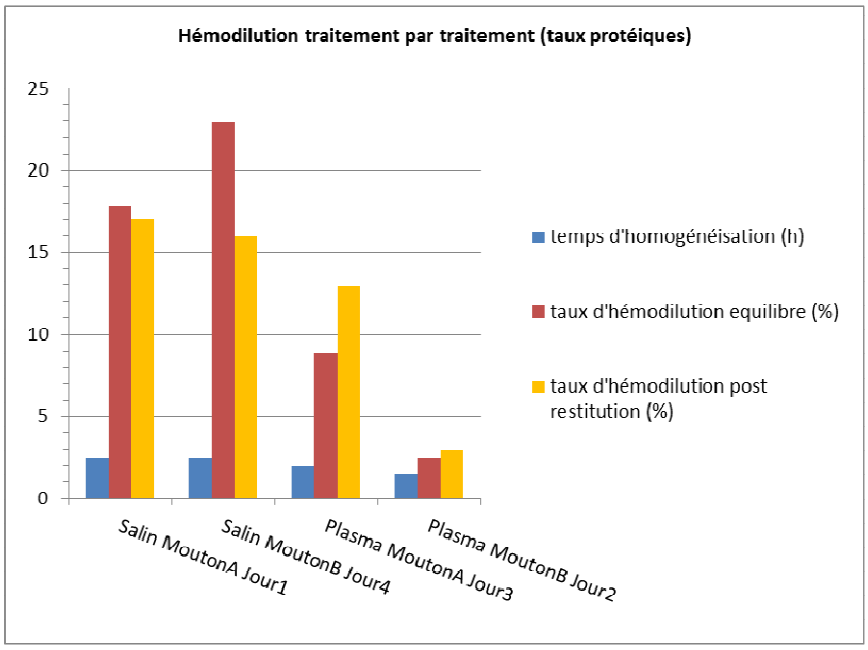


Figure 196: Données d'hémodilution (protéines totales) traitement par traitement

V.2.3.1.2 Hématocrite

L'hématocrite a aussi été utilisé pour suivre l'hémodilution. Cependant, l'hémodilution est peu observable avec les résultats obtenus (cf. figure 197). La variabilité des mesures semble importante.

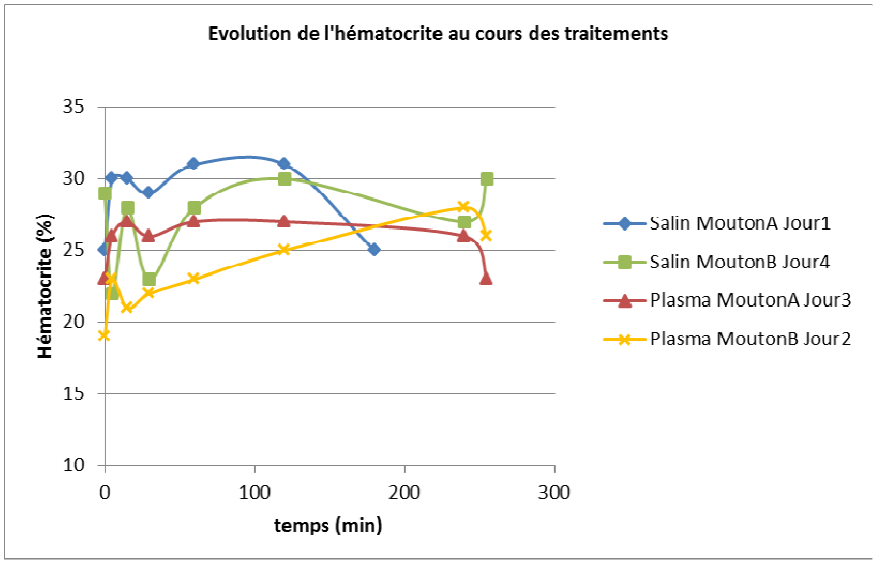


Figure 197: Evolution de l'hématocrite du sang de l'animal traitement par traitement

V.2.4 Fluidisation

Les bioréacteurs en parallèle au sein d'un même circuit on des niveaux de fluidisation assez comparables : des différences de hauteur de lit allant de 0 à 0,5cm sont observées.

Des différences de fluidisation auraient pu être attendues entre les traitements avec un priming au plasma et ceux avec un priming au sérum physiologique. Cependant, les conditions de fluidisation sont similaires pour les deux types de traitements.

Au repos, le lit tassé est d'environ 2cm dans tous les cas (équivalent au 50ml de billes introduites). Puis, lors de la recirculation avant le traitement, le lit se trouve autour des 3cm soit une porosité d'environ 0,55. Après une heure de traitement, la hauteur de lit est d'environ 3,5cm soit une porosité de plus de 0,6. L'expansion du lit augmente ensuite encore au cours du temps (la porosité atteint plus de 0,65). Le débit de 20ml/min dans chaque bioréacteur est resté inchangé tout au long des traitements.

Au cours des deux premières heures, il y a une augmentation de la masse volumique du fluide de perfusion dû à l'augmentation du taux protéique. Le lit augmente donc progressivement sa porosité. Aucun suivi de la température n'a été effectué au niveau du circuit secondaire. Il est donc difficile de juger de l'impact de la température sur la porosité du lit fluidisé.

Les valeurs de porosité des lits fluidisés sont hautes par rapport à celles attendues (déterminées à partir des résultats obtenus avec du sang bovin). Ces valeurs hautes s'expliquent surement par le fait que les billes produites étaient de mauvaise qualité (air dans les billes et tailles inhomogènes) du faite du bouchage des buses du système de fabrication. Beaucoup de billes ont été éliminées et les bioréacteurs n'ont pas pu être remplis à 125ml comme le prévoit normalement la thérapie mais seulement avec 50ml de billes chacun (cf. figure 198).

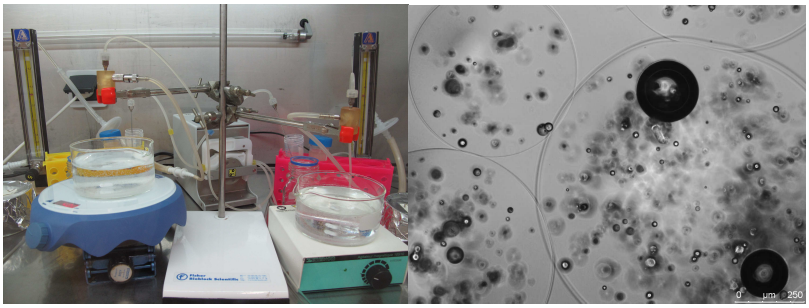


Figure 198: A gauche : Photo de la fabrication des billes. A droite, les billes toutes juste fabriquées.

V.3 ESSAI *IN VITRO* A GRANDE ECHELLE

Un essai *in vitro* à grande échelle a été réalisé à la fin de ce doctorat. Le but de cet essai a été de valider l'utilisation de la cartouche MARS comme bioréacteur en cultivant des sphéroïdes de cellules C3 encapsulés pendant plusieurs jours dans celui-ci. Ces travaux ne sont pas présentés en détails dans ce manuscrit mais ils ont fait l'objet d'une soumission de publication pour le congrès IEEE EMBC disponible en annexe.

La méthode de fabrication des sphéroïdes en boite de Petri a été adaptée à la grande échelle : 150ml de billes contenant des sphéroïdes de cellules C3A, encapsulés à une densité de 20M/ml, ont été mis en culture dans un bioréacteur de 250ml dans une circulation extracorporelle contenant seulement le réchauffeur/oxygénateur Hilite 800. Le circuit a été rempli avec du milieu MEM. Une sonde a permis de contrôler la température et la concentration d'oxygène du milieu.

Les sphéroïdes ont été maintenus viables et fonctionnels (production d'albumine et consommation de glucose) dans ces conditions pendant 4 jours. La fonctionnalité des cellules doit être améliorée pour répondre au critère d'une suppléance hépatique réellement efficace. Ces résultats sont néanmoins encourageants pour les futurs essais précliniques de fonctionnalité avec un système complet (circuit extracorporel et cellules).

V.4 CONCLUSION

Ces premiers essais précliniques visaient à s'assurer de la sécurité de l'ensemble du circuit extracorporel et de son monitorage. Le modèle animal choisi était donc simple (moutons sains), et les investigations se sont concentrées essentiellement sur les paramètres hémodynamiques de l'animal et du circuit. En dehors de problèmes de coagulation qui ont été gérés au fur et à mesure, les essais ont pu démontrer la sécurité d'utilisation du dispositif SUPPLIVER avec l'ensemble de ses composantes, en dehors de la phase biologique (les billes d'alginate insérées dans les bioréacteurs étaient vides). L'interrogation sur le fluide à utiliser pour le remplissage du circuit secondaire a pu être levée : le remplissage avec du plasma ou un fluide équivalent est à favoriser par rapport à une solution sérum physiologique, car la dilution des protéines est très fortement minimisée. Le priming au plasma n'est pas plus complexe à mettre en œuvre et aucun problème ne s'est produit lors des étapes supplémentaires qu'il engendre. Il est donc désormais prévu de poursuivre ces essais précliniques chez un modèle porcin d'insuffisance hépatique. Néanmoins, différentes améliorations et études complémentaires pourraient être réalisées en parallèle *in vitro* pour améliorer la configuration globale du traitement.

Si la fluidisation des billes s'est mise en place correctement dans l'ensemble des circuits, et de façon homogène dans les bioréacteurs en parallèle, une expansion importante du lit fluidisé au cours du traitement a été observée. Si la qualité des billes peut en être responsable, l'autre piste à explorer est le suivi en ligne de la température. Des expérimentations de mesure des pertes thermiques du circuit devront être réalisées en incluant les billes dans les bioréacteurs. Les différentes étapes du remplissage sont à reproduire pour observer l'impact de celles-ci sur l'évolution de la température au sein du circuit. Le mieux serait de trouver une manière non invasive de pouvoir faire le suivi de la température. Il conviendrait aussi de revoir la procédure de restitution en faisant des essais en laboratoire pour connaitre le débit optimal et le temps optimal de restitution du plasma du circuit secondaire. Il faudrait aussi s'attacher à améliorer la restitution du sang du circuit primaire. Le but initial de faire un circuit extracorporel complètement hybride en mélangeant des détoxifications artificielles et biologiques n'a pas pu être complètement atteint du fait de l'incompatibilité entre la cartouche IE250 et une perfusion de plasma. Les développements seront à réaliser pour rendre cette cartouche compatible ou pour l'emploi d'un autre dispositif car le concept d'utiliser une cartouche d'adsorption dans le circuit plasmatique reste toutefois pertinent.

Enfin, une validation biologique a été réalisée avec un essai *in vitro* à grande échelle. La cartouche MARS et le réchauffeur/oxygénateur Hilite 800 ont été utilisés avec succès pour cultiver une grande quantité de sphéroïdes de C3A encapsulés dans du milieu de culture.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Depuis plusieurs années, à l'Université de Technologie de Compiègne, au sein de l'UMR CNRS 7338 (laboratoire de biomécanique et de bioingénierie), des travaux ont été accomplis pour l'élaboration d'un bioréacteur à lit fluidisé, contenant des hépatocytes humains encapsulés dans des billes d'alginate, pour pallier l'insuffisance hépatique sévère. La réalisation du traitement et la bonne fonctionnalité des cellules ne peuvent être envisageables sans la conception d'une circulation extracorporelle comportant des composants artificiels assurant un environnement favorable aux cellules (oxygénateur, pré-détoxification…) et la sécurité du patient. Le but de ce doctorat CIFRE au sein de la société Gambro et de l'UTC a donc été de concevoir une telle circulation pouvant assurer le bon fonctionnement du bioréacteur à lit fluidisé dans le but de préparer des essais précliniques et de futurs essais cliniques.

Une circulation extracorporelle complète a ainsi été conçue et réalisée selon un cahier des charges initialement fixé. Elle contient un plasmafiltre (TPE2), quatre bioréacteurs en parallèle (cartouches MARS), un oxygénateur/réchauffeur (Hilite 800), une cartouche de charbon actif (Adsorba), une cartouche échangeuses d'ions (IE250) et un filtre à particules (TPE2). Destinée dans sa version actuelle à des patients de faible poids, elle est cependant facilement adaptable pour une taille adulte. Le pilotage de cette circulation extracorporelle se fait de manière simple et sûre grâce à la création d'une thérapie et d'alarmes par l'intermédiaire du logiciel X-Lab. Des essais avec le circuit complet sans cellules ont été réalisés avec succès *in vitro* avec du sang bovin et *in vivo* sur un modèle ovin non pathologique. Ils ont permis de mettre en évidence la nécessité d'un remplissage du circuit secondaire avec du plasma pour limiter l'hémodilution. Le traitement est bien toléré sur le plan hémodynamique par les animaux et les alarmes du système ont permis de bien gérer les situations critiques, ce qui est encourageant pour les essais à venir.

Des interrogations subsistent néanmoins quant à la pertinence du choix de certains éléments de la circulation extracorporelle. Il serait intéressant de trouver une alternative à la cartouche échangeuses d'ions IE250 ou d'utiliser un filtre moins perméable que le plasmafiltre pour retenir les protéines de la coagulation. Un effet bénéfique de la réduction du taux d'ammoniac par l'Adsorba a été observé sur des sphéroïdes de cellules C3A encapsulés, mais ces résultats sont à reproduire. Il conviendrait aussi d'analyser par une poursuite d'essais spécifiques, si l'oxygénateur peut réellement être un atout pour l'amélioration des activités métaboliques des cellules encapsulées. Il pourrait aussi être intéressant de lier les mesures d'apport et de consommation d'oxygène à la mise en évidence (ou non) d'un phénomène reproduisant la zonation au sein des billes [110].

Enfin, concernant la gestion de la sécurité du patient, il conviendrait de trouver un filtre à particules plus adapté pour éviter que les éventuels débris de billes et de cellules échappés des bioréacteurs n'atteignent le patient (filtre du système MARS par exemple).

Lors du choix des bioréacteurs utilisables en clinique, nous nous sommes assurés que le comportement du lit fluidisé de billes dans du plasma pouvait être comparé à celui déjà décrit et analysé pour les bioréacteurs à l'échelle du laboratoire avec du sérum physiologique et du milieu de culture. Cette approche a imposé la mise en œuvre d'un alourdissement des billes d'alginate par des microparticules de verre afin de tenir compte des différences de masse volumique qui guident le comportement du lit fluidisé. Il a alors été démontré que la présence de ces particules n'était pas délétère pour la bioencapsulation, tant au niveau biologique que mécanique. Cependant, lors d'un traitement, le taux protéique et la température sont susceptibles de varier de manière assez importante avec un impact direct sur la fluidisation. Il sera donc intéressant à l'avenir de contrôler de manière non invasive l'évolution de la température lors des différentes étapes du traitement pour ainsi maîtriser au mieux la fluidisation. Le réchauffeur Hilite 800 possède par exemple un doigt de gant métallique sur la sortie sang, destiné à recevoir une sonde de température, qu'il serait intéressant de tester. De plus, le développement d'un détecteur avertissant du dépassement d'une hauteur de lit fluidisé maximale permettrait de s'affranchir d'un contrôle visuel de la fluidisation.

Une validation biologique du fonctionnement du bioréacteur a pu être réalisée avec un essai *in vitro* à grande échelle. La cartouche MARS et le réchauffeur/oxygénateur Hilite 800 ont été utilisés avec succès pour cultiver, dans du milieu de culture, une grande quantité de sphéroïdes de cellules C3A encapsulés. Les cellules sont restées fonctionnelles pendant au moins 4 jours (production d'albumine et consommation d'urée). Ce résultat est très encourageant pour la poursuite des expérimentations de fonctionnalité avec un circuit complet (bioréacteurs avec des billes contenant des cellules).

Néanmoins, la production en masse de billes d'alginate pour le passage à l'échelle humaine doit impérativement être améliorée. Le protocole de production des billes avec l'appareil Nisco doit être revu pour la poursuite d'essais de grande ampleur. En effet, l'ajout de microparticules de verre complexifie la production des billes à grande échelle. La stérilisation par filtration étant fastidieuse et peu adaptée aux grands volumes, la stérilisation par autoclavage de l'alginate a été testée. Les billes d'alginate autoclavé sont cependant très difficiles à former du fait d'une altération des propriétés mécaniques de l'alginate. Une étude paramétrique spécifique devra être menée au laboratoire en se basant sur la littérature pour définir un procédé de fabrication des billes d'alginate fiable à grande échelle.

La production de sphéroïdes par agitation orbitale en boites de Petri sigmacoatées s'avère être une technique intéressante surtout pour des cellules non proliférantes et rapidement fonctionnelles telles que les cellules primaires. Elle nécessite de disposer d'une grande quantité de cellules avant le traitement ou d'être associée à une méthode de cryopréservation permettant le maintien des capacités métaboliques des cellules. Le processus de production pourra être amélioré pour atteindre des capacités comparables à celles d'autres systèmes de production de sphéroïdes en masse [67]. Si à l'avenir, des cellules iPS sont envisagées pour notre application [104] , une phase de prolifération dans les billes pourra être prévue, sur la base des travaux déjà réalisés dans cette thèse avec les C3A, avant que les cellules encapsulées ne soient disponibles pour le traitement.

L'optimisation de la fluidisation par l'ajout de microparticules de verre et le développement d'une circulation extracorporelle fiable nous permettent d'envisager très prochainement des essais précliniques chez un modèle porcin d'insuffisance hépatique pour un prochain projet de recherche. Toutefois, comme il a été décrit ci-dessus, plusieurs études complémentaires in vitro pourraient être conduites pour améliorer la configuration globale du traitement avant ces prochains essais. Les travaux réalisés au niveau des modes de culture (production de sphéroïdes ou prolifération in situ dans les billes) et la qualification biologique du bioréacteur nous confortent quant à la réussite des prochains essais précliniques de fonctionnalité. La principale problématique reste le choix du type cellulaire à encapsuler.

En effet, le projet SUPPLIVER nous a convaincus de la faible disponibilité de cellules hépatiques primaires humaines, ainsi que de la perte assez rapide de leurs capacités métaboliques. Il est donc impératif, dès à présent, d'envisager l'usage d'autres types cellulaires qui seront à la fois performants et autorisés par les affaires réglementaires. Le laboratoire analyse déjà deux approches : i) dans le cadre d'un projet européen, la co-culture d'hépatocytes primaires avec d'autres types de cellules non parenchymateuses du foie, sous forme de sphéroïdes afin de favoriser les interactions cellules-cellules ; ii) l'encapsulation de cellules souches pluripotentes différenciées en hépatocytes, grâce à la collaboration avec l'équipe d'A. Dubart-Kupperschmitt, experte de ce domaine, au sein de l'Unité Inserm U1193 (Villejuif).

L'approche modulaire que nous avons adoptée dans ce projet permettra, à partir des acquis sur le circuit extracorporel complet, le bioréacteur et la microencapsulation, de proposer une thérapie exploitant ces nouvelles pistes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Pr. Eric Pujade-Lauraine, Mme Bénédicte Votan, *ARCAGY – GINECO* [en ligne], mis à jour le 25/11/2013 [consulté 02/2015], http://www.arcagy.org (Sites certifiés en partenariat avec la Haute Autorité de Santé (HAS))

[2] P.L. Toutain, *La Physiologie Digestive: vue générale* [en ligne], ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE, mis à jour 09/2011 [consulté 02/2015], http://www.slideserve.com/

[3] R. Thibaut, G. Vincke, E. Depiereux, M. Raes, Atlas d'Histologie humaine et animale [en ligne], mis à jour 03/2007 [consulté 02/2014], http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/

[4] Pr. Eric Pujade-Lauraine, Mme Bénédicte Votan, ARCAGY – GINECO [en ligne], mis à jour 11/2013 [consulté 02/2015], http://www.arcagy.org (Sites certifiés en partenariat avec la Haute Autorité de Santé (HAS))

[5] A.Y. Hui, S.L. Friedman (2003) Sinusoidal events during fibrosing liver injury. Expert Reviews in Molecular Medicine 5: 14

[6] U. Frevert, S. Engelmann, S. Zougbédé, J. Stange, B. Ng, K. Matuschewski, L. Liebes, H. Yee (2005) Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. PLoS Biology 3(6)

[7] Sharon Mantik Lewis, Margaret M. Heitkemper, Shannon Ruff Dirksen Soins infirmiers: Médecine-chirurgie Groupe de Boeck, 2011, Chapitre 67 page 935

[8] David L. Nelson Michael M. Cox Lehninger Principles of Biochemistry W. H. Freeman, Hardback, Fifth edition, 2008

[9] V. Allen 78 Steps Health Journal[en ligne] mis à jour 09/2011 [consulté 02/2015] http://www.78stepshealth.us/human-physiology/r-1.html

[10] F. Capron, C. Duyckaerts, P. Fouret, J.J. Hauw, M.H. Aubriot, I. Brocheriou, F. Charlotte, A. Delcour, A ; Handra,-Luca, C. Hoang, D. Seilhean, Service d'anatomo-pathologie du CHU Pitié-Salpêtrière TP d'anatomie pathologique Niveau PCEM2 [en ligne] mis à jour 11/2002 [consulté 02/2015] http://www.chups.jussieu.fr/polys/anapath/TP/index.html

[11] J.G. O'Grady, S.W. Schalm, W.R. Lancet (1993) Acute liver failure: redefining the syndromes. The Lancet 342: 273–75

[12] F. Adnet, S. Atout, M. Galinski, F. Lapostolle. (2005) Évolution des intoxications médicamenteuses volontaires en France. Réanimation 14(8): 721-726

[13] W. Bernal, J. Wendon (2013) Acute Liver Failure. The New England Journal of Medicine 369: 2525-2534

[14] J.M. Burnell, J.K. Dawborn, R.B. Epstein, R.A. Gutman, GE Leinbach, E.D. Thomas (1967) Acute hepatic coma treated by cross circulation or exchange transfusion. New England Journal of Medicine 276(17): 935-43

[15] S.J. Munoz, S.K. Ballas, M.J. Moritz, J. Martinez, L.S.Friedman, B.E. Jarrell, W.C. Maddrey (1989) Perioperative management of fulminant and subfulminant hepatic failure with therapeutic plasmapheresis. Transplantation Proceedings 21(3): 3535-6

[16] I. Vidal, N. Blanchard, M.P. Chenard-Neu, P. Bachellier , B. Heyd , F. Staedtler , M. Schumacher , E. Alexandre , L. Richert (2014) Increased survival despite failure of transplanted human hepatocyte implantation into liver parenchyma of nude mice with repeated lethal jo2-induced liver deficiency. Cell Transplantation 23(12): 1557-72

[17] S. Jitraruch, A. Dhawan, R.D. Hughes, C. Filippi, D. Soong, et al. (2014) Alginate Microencapsulated Hepatocytes Optimised for Transplantation in Acute Liver Failure. PLoS One 9(12): e113609. doi:10.1371/journal.pone.0113609

[18] Wikipédia Hémodialyse [en ligne] mis à jour 02/2015 [consulté 02/2015] http://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9modialyse

[19] K. Chakrabarti Dialysis [en ligne] mis à jour 04/2013 [consulté 02/2015] http://fr.slideshare.net/DocKriti/dialysis-18751425

[20] R.D. Hugues, R. William (1993) Use of sorbent columns and hemofiltration in fulminant hepatic failure. Blood Purification 11:163-169

[21] B. Struecker, N. Raschzok, I. M. Sauer (2014) Liver support strategies: cutting-edge technologies. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 11: 166–176

[22] K. Rafai, T. Ernst, U. Kretschmer, M.J. Barh, A. scheinder, C. Hafer, H. Haller, M.P. Manns, D. Fliser (2003) Prometheus –a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. Journal of Hepatology 39: 984-990

[23] P. Krisper, B. Haditsch, R. Stauber, A. Jung, V. Stadlbauer, M. Trauner, H. Holzer, D. Schneditz (2005) In vivo quantification of liver dialysis: comparison of albumin dialysis and fractionated plasma separation. Journal of Hepatology 43: 451-457

[24] Wikipédia Liver support system [en ligne] mis à jour 01/2015 [consulté 02/2015] http://en.wikipedia.org/wiki/Liver_support_systems

[25] F. Wong (2007) Drug Insight: the role of albumin in the management of chronic liver disease. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 4: 43-51

[26] J. Stange, S.R. Mitzner, T. Risler, C.M. Erley, W. Lauchart , H. Goehl , S. Klammt , P. Peszynski , J. Freytag , H. Hickstein , M. Löhr , S. Liebe , W. Schareck , U.T. Hopt , R. Schmidt (1999) Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS): Clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. Artificial Organs 23(4) : 319-330

[27] S. Mitzner, S. Klammt, J. Stange, R. Schmidt (2006) Albumin regeneration in liver support: comparison of different methods. Therapeutic Apheresis and Dialysis 10(2): 108-117

[28] B. Carpentier, A. Gautier, C. Legallais (2009) Artificial and bioartificial liver devices: present and future. Gut 58(12): 1690-702.

[29] R. Chalumeau, P. Poyck and M.P. van de Kerkhove (2006) Bioartificial liver: its pros and cons. Therapeutic Apheresis and Dialysis 10(2)/ 168-174

[30] E.L. LeCluyse, R.P. Witek, M.E. Andersen, and M.J. Powers (2012) Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. Critical Review in Toxicology 42(6): 501-548

[31] A.A. te Velde, M.L. Flendring, N.C. Ladiges, R.A. Chalumeau (1997) Immunological consequences of the use of xenogeneic hepatocytes in a bioartificial liver for acute liver failure. International journal of artificial organs 20(4): 229-33

[32] T. Touboul, N.R. Hannan, S. Corbineau, A. Martinez, C. Martinet, S. Branchereau, S. Mainot, H. Strick-Marchand, R. Pedersen, J. Di Santo, A. Weber, L. Vallier (2010) Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. Hepatology 51(5): 1754-65

[33] N. Dianat, C. Steichen, L. Vallier, A. Weber, A. Dubart-Kupperschmitt (2013) Human pluripotent stem cells for modelling human liver diseases and cell therapy. Current Genetic Therapies 13(2): 120-32

[34] K. Takahashi, S. Yamanaka (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 25 126 (4): 663-76

[35] M. Baxter, S. Withey, S. Harrison (2015) Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. Journal of Hepatology 62(3): 581-9

[36] R.Z. Lin, H.Y. Chang (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnology Journal 3(9-10): 1172-84

[37] K. Wrzesinski, A. Rogowska-Wrzesinska, R. Kanlaya, K. Borkowski, V. Schwämmle, J. Dai, K.E. Joensen, K. Wojdyla, V.B. Carvalho, S.J. Fey (2014) The cultural divide: exponential growth in classical 2D and metabolic equilibrium in 3D environments. PLoS One 15: 9(9)

[38] Y. Ying, L. Jianzhou, P. Xiaoping, Z. Pencheng, Y. Xiaopeng, C. Hongeui, W. Yingjie, L. Lanjuan (2013) Co-culture with mesenchymal stem cells enhances metabolic functions of liver cells in bioartificial liver system. Biotechnology and Bioengineering 110(3): 958-968

[39] R.J. Thomas, R. Bhandari, D.A. Barrett, A.J. Bennett, J.R. Fry, D. Powe, B.J. Thomson, K.M. Shakesheff (2005) The Effect of Three-Dimensional Co-Culture of Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells on Key Hepatocyte Functions in vitro. Cells Tissues Organs 181: 67–79

[40] I. Jasmund, A. Langsch, R. Simoteit, A Bader (2002) Cultivation of primary porcin hepatocytes in an OX-HFB for use as a bioartificial liver device. Biotechnology Process 18(4): 839-46

[41] C.1. Planchamp, T.L. Vu, J.M. Mayer, M. Reist, B. Testa (2003) Hepatocyte hollow-fiber bioreactors: design, set-up, validation and applications. Journal of Pharmacy and Pharmacology 55(9): 1181-98

[42] Modifié à partir de: C.1. Planchamp, T.L. Vu, J.M. Mayer, M. Reist, B. Testa (2003) Hepatocyte hollow-fiber bioreactors: design, set-up, validation and applications. Journal of Pharmacy and Pharmacology 55(9): 1181-98

[43] Y. Wang, T. Susando, X. Lei, C. Anene-Nzelu, H. Zhou, L.H. Liang, H. Yu (2010) Current developments of bioreactors for extracorporeal bioartificial liver. Biointerphases 5(3): 116-129

[44] C. Legallais., E. Dore. and P. Paullier. (2000) Design of a fluidized bed bioartificial liver (FBBAL). Artificial Organs 24(7): 519-525

[45] B. David, E. Dore, M.Y Jaffrin., C. Legallais (2004) Mass transfers in a fluidized bed bioartificial liver using alginate beads. International Journal of Artificial Organs 27(4) : 284-293

[46] Guy Mareels, Experimental modeling of low and mass transport in a bioartificial liver, sous la direction de P. Verdonck, Université de Gent, 2008 (adapté de C. Legallais, B. David and E. (2001) Dore Bioartificial Livers (BAL) : Current technological aspects and future developments. Journal of Membrane Science 181(1): 81-95)

[47] S.L. Nyberg, J. Hardin, B. Amiot, U.A. Argikar, R.P. Remmel, P. Rinaldo. (2005) Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. Liver Transplantation 11(8): 901-10

[48] S. Harm, K. Stroble, J. Hartmann, D. Falkenhagen. (2009) Alginate-encapsulated human hepatoma C3A cells for use in a bioartificial liver device - the hybrid-MDS. International Journal of Artificial Organs 32(11): 769-78

[49] B. Struecker, N. Raschzok & I. M. Sauer (2013) Liver support strategies: cutting-edge technologies. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 11: 166–176

[50] J.M. Millis, D.C. Cronin, R. Johnson, H. Conjeevaram, C. Conlin, S. Trevino, P. Maguire (2002) Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. Transplantation 74(12): 1735-46

[51] N.L. Sussman, G.T. Gislason, G.A. Colin, J.K. Kelly, (1994) The Hepatix extracorporeal liver assist device : Initial clinical experience. Artificial Organs 18(5): 390-396

[52] A.J. Ellis, R.D. Hugues, J.A. Wendon, J. Dunne, P.J. Langley, J.H. Kelly, et al. (1996) Pilot-control trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. Hepatology 24(6): 1446-51

[53] A.A. Demetriou, J. Rozga, L. Podesta, E. Lepage, E. Morsiani, A.D. Moscioni, A.Hoffman,M. McGrath, L. Kong, H. Rosen, et al. (1995) Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver. Scandinavian Journal Gastroenterology Supplement 208: 111-7

[54] M.P. Van de Kerkhove, R. Hoekstra, R.A. Chamuleau, T.M. van Gulik. (2004) Clinical application of bioartificial liver support systems. Annals of Surgery 240(2): 216-30

[55] A.A. Demetriou, R.S. Brown Jr, R.W. Busuttil, J. Fair, B.M. McGuire, P. Rosenthal, J.S. 2nd Am Esch, J. Lerut, S.L. Nyberg, M. Salizzoni, E.A. Fagan, B. de Hemptinne, C.E. Broelsch, M. Muraca, J.M. Salmeron, J.M. Rabkin, H.J. Metselaar, D. Pratt, M. De La Mata, L.P. McChesney, G.T. Everson, P.T. Lavin, A.C. Stevens, Z. Pitkin, B.A. Solomon. (2004) Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. Annals of Surgery 239(5): 660-7

[56] Choon Hyuck David Kwon, Suk-Koo Lee, Jung-Keug Park Doo-Hoon Lee, and Ji-Hyun Lee. (2011) Artificial Liver Devices and Bioartificial Liver Systems: Current Status. The Journal of the Korean Society for Transplantation 25(1): 15-21

[57] E. Doré, C. Legallais (1999) A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. Therapeutic Apheresis and Dialysis 3(3): 264-7

[58] Aude Gautier, Etude des écoulements et des transferts de masse dans différentes géométries de foie bioartificiel, sous la direction C. Legallais, Université de Technologie de Compiègne 2008

[59] Bertrand David, Mise en place et validation d'un modèle in vitro pour l'étude des propriétés mécaniques diffusives et métaboliques d'un foie bioartificiel à lit fluidisé, sous la direction de C. Legallais, Université de Technologies de Compiègne, 2002

[60] Emmanuel Doré, Conception d'un foie bioartificiel à lit fluidisé, sous la direction de C. Legallais, Université de Technologie de Compiègne, 1999

[61] M. Desille, S. Mahler, P. Seguin, Y. Mallédant, B. Frémond, V. Sébille, A. Bouix, J. F. Desjardins, Joly A, Desbois J, Lebreton Y, Campion JP, B. Clément (2002) Reduced encephalopathy in pigs with ischemia-induced acute hepatic failure treated with a bioartificial liver containing alginate-entrapped hepatocytes. Critical Care Medicine 30(3): 658-63

[62] A. Gautier, B. Carpentier, M .Dufresne, Q. Vu Dinh, P. Paullier, C. Legallais (2011) Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and the metabolic activities of encapsulated C3A cells in bioartificial liver applications. European Cells and Materials 21: 94-106

[63] S.H. Capone, M. Dufresne, M. Rechel, M.J. Fleury, A.V. Salsac, P. Paullier, M. Daujat-Chavanieu, C. Legallais (2013) Impact of Alginate Composition: From Bead Mechanical Properties to Encapsulated HepG2/C3A Cell Activities for In Vivo Implantation. PLos One. 25; 8(4): e62032. doi:10.1371/journal.pone.0062032

[64] S.M. Coward, C. Legallais, B. David, M. Thomas, Y. Foo, D. Mavri-Damelin, H.J. Hodgson, C. Selden (2009) Alginate-encapsulated HepG2 cells in a fluidized bed bioreactor maintain function in human liver failure plasma. Artificial Organs 33(12): 1117-26

[65] E. Erro, J. Bundy, I. Massie, S.A. Chalmers, A. Gautier, S. Gerontas, M. Hoare, P. Sharratt, S. Choudhury, M. Lubowiecki, I. Llewellyn, C. Legallais, B. Fuller, H. Hodgson, C. Selden (2013) Bioengineering the liver: scale-up and cool chain delivery of the liver cell biomass for clinical targeting in a bioartificial liver support system. Bioresearch Open Access 2(1): 1-11

[66] C. Selden, C. W. Spearman, D.Kahn, M. Miller, A. Figaji, E. Erro, J. Bundy, I. Massie, S. Chalmers, H. Arendse, A. Gautier, P. Sharratt, B. Fuller, H. Hodgson. (2013) Evaluation of Encaspulated Liver Cell Spheroids in a Fluidized-bed Bioartificial Liver for Treatment of Ischaemic Acute Liver failure in Pigs in a Translational Setting. Plos One 8(12)

[67] S.L. Nyberg, J. Hardin, B. Amiot, U.A. Argikar, R.P. Remmel, P. Rinaldo (2005) Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. Liver Transplantation 11(8): 901-10

[68] J.M. Glorioso, S.A. Mao, B. Rodysill, T. Mounajjed, W.K. Kremers, F. Elgilani, R.D. Hickey, H. Haugaa, C.F. Rose, B. Amiot, S.L. Nyberg (2015) Pivotal Preclinical Trial of the Spheroid Reservoir Bioartificial Liver. Journal of Hepathology http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.021

[69] Cheng-Bo Yu, Xiao-Ping Pan, Liang Yu, Xiao-Peng Yu, Wei-Bo Du, Hong-Cui Cao, Jun Li, Ping Chen, and Lan-Juan Li (2014) Evaluation of a novel choanoid fluidized bed bioreactor for future bioartificial livers. World Journal of Gastroenterology 20(22): 6869–6877

[70] Y. Ying, L. Jianzhou, P. Xiaoping, Z. Pencheng, Y. Xiaopeng, C. Hongeui, W. Yingjie, L. Lanjuan (2013) Co-culture with mesenchymal stem cells enhances metabolic functions of liver cells in bioartificial liver system. Biotechnology and Bioengineering 110(3): 958-968

[71] J.-H. Lee, D.-H Lee, J.-K. Park, S.-K. Kim, C.H.D. Kwon, and S.-K Lee (2012) Potentiality of Immobilized Pig Hepatocyte Spheroids in bioartificial Liver System. Transplantation Proceedings 44: 1012-1014

[72] S. Harm, K. Stroble, J. Hartmann, D. Falkenhagen. (2009) Alginate-encapsulated human hepatoma C3A cells for use in a bioartificial liver device - the hybrid-MDS. International Journal of Artificial Organs 32(11): 769-78

[73] Guidelines on human cell-based medicinal products EMA 2008 / Procedural advice on the provision of scientific recommendation on classification of advanced therapy medicinal products in accordance whit article 17 of regulation (ec) n°1394 / 2007 EMA

[74] Réglementation (EC) N° 1394/2007 Official Journal of the European Union 2007 1394

[75] Directive 2001/83/CE Official Journal of the European Union 2001

[76] Directive 2009/120/EC Official Journal of the European Union 2009 September 3-12

[77] Règlement (CE) n°726/2004 Official Journal of the European Union 2004 1-33

[78] European Pharmacopoeia Alginic Acid 2011

[79] F 2064-00 Standard Guide for Characterization and Testing of Alginates as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue- Engineered Medical Products Application 1 Annual book of ASTM Standards 2008

[80] F 2315-11 Standard Guide for Immobilization or Encapsulation of Living Cells or Tissue in Alginate Gels 2011

[81] ISO 10993 : 2010 Evaluation biologique des dispositifs médicaux

[82] http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Produit-therapeutiques-annexe-PTA/(offset)/7

[83] NF EN 62366 Dispositifs médicaux - Application de l'ingénierie de l'aptitude à l'utilisation aux dispositifs médicaux Mars 2008

[84] NF EN 62304 Logiciels de dispositifs médicaux - Processus du cycle de vie du logiciel Octobre 2006

[85] W. A. M. Alloue, J. Destain, H. Ghalfi, P. Thonart, M. Aguedo, J. P. Wathelet and C. Blecker (2008) Les lipases immobilisées et leurs applications. Biotechnologies, Agronomie, Société et Environnement 12(1)

[86] S. Bouquelet Université de Sciences et Technologie de Lille Polysaccharides alimentaires [en ligne] mis à jour 03/2008 [consulté 04/2015] http://biochim-agro.univlille1.fr/polysaccharides/co/Contenu_7_2.html

[87] M. Davidovich-Pinhas, H. Bianco-Peled (2010) A quantitative analysis of alginate swelling. Carbohydrate Polymers 79: 1020-1027

[88] Y. Chen, C. Yu, G. Lv, H. Cao, S. Yang, Y. Zhang, J. Yu, X. Pan, L. (2014) Rapid Large-Scale Culturing of Microencapsulated Hepatocytes: A Promising Approach for Cell-Based Hepatic Support. Transplantation Proceedings 46(5): 1646-1657

[89] B. David, L. Barbe, D. Barthès-Biesel, C. Legallais (2006) Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor. International Journal of Artificial Organs 29(8) : 756-63

[90] N. Wang, G. Adams, L. Buttery, F.H. Falcone, S. Stolnik (2009) Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. Journal of Biotechnologies 144(4): 304-12

[91] W. Zhong, P. Urayama and M.A. Mycek1 (2003) Imaging fluorescence lifetime modulation of a ruthenium-based dye in living cells: the potential for oxygen sensing. Journal of Physics 36(14): 1689-1695

[92] G. Mehta, K. Mehta, D. Sud, J.W. Song, T. Bersano-Begey, N. Futai, Y. Seok Heo, M.A. Mycek, J.J. Linderman, S. Takayama (2007) Quantitative measurement and control of oxygen levels in microfluidic poly(dimethylsiloxane) bioreactors during cell culture. Biomedical Microdevices 9: 123–134

[93] A. Delebarrre, École des Mines de Nantes, Systèmes Energétiques et de l'Environnement, UMR CNRS 614 Fluidisation des solides par un gaz [en ligne] mis à jour 06/2007 [consulté 04/2015] http://nte.mines-albi.fr/STP/co/OU8.html

[94] A. Stoukov, INP Toulouse ENSEEIHT Présentation des lits fluidisés [en ligne] mis à jour 06/2013 [consulté 04/2015] http://hmf.enseeiht.fr/travaux/projnum/book/export/html/1426

[95] M. Hartman, O. Trnka et K. Svoboda (1994) Free settling of nonspherical particles. Industrial and Engineering Chemistry Research 33: 1979-1983

[96] J.F. Richardson et W. N. Zaki (1954) Sedimentation and fluidization. Transactions of the Institution of Chemical Engineers (75): 82-100

[97] P.U. Foscolo, L.G. Gibilaro et S.P. Waldram (1980) A unified model for particulate expansion of fluidized beds and flow in fixed porous media. Chemical Engineering Society 38(8): 1251-1260

[98] U.P. Ganguly (1980) Direct method for prediction of expanded deb height in liquid-solid fluidization. Canadian Journal of Chemical Engineering 58: 559-563

[99] A. Hirata et F.B. Bulos (1990) Predicting bed voidage in solid-liquid fluidization. Journal of Chemical Engineering of Japan 23(5): 599-604

[100] S. Knasmüller, W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, V. Mersch-Sundermann, G. Williamson, G. Hietsch, T. Langer, F. Darroudi, A.T. Natarajan (1998) Use of the metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutation Research 402: 185-202

[101] R.J.X. Zawada, P. Kwan, K.L. Olszewski, M. Llinas, and S.G.Huang (2009) Quantitative determination of urea concentrations in cell culture medium. Biochemestry and Cell Biology 87: 541–544

[102] Traduit du document: X-Lab Software Overview de Hiram Rada, 2014

[103] D.G. Karamanez et N. L. Nikolov (1992) Bed Expansion of Liquid-Solid Fluidization. American institute of Chemical Engineers 38(12): 1916-1622

[104] Y. Tabata, I. Horiguchi, M.P. Lutolfb and Y. Sakai (2014) Development of bioactive hydrogel capsules for the 3D expansion of pluripotent stem cells in bioreactors. Biomaterials Science 2: 176-183

[105] G. Liumbruno, F. Bennardello, A. Lattanzio, P. Piccoli, and G. Rossettias (2009) Recommendations for the use of albumin and immunoglobulins. Blood Transfusion 7(3): 216–234

[106] L. Falasca, A. Miccheli, E. Sartori, A. Tomassini, L. Conti Devirgiliis (2001) Hepatocytes entrapped in alginate gel beads and cultured in bioreactor: rapid repolarization and reconstitution of adhesion areas. Cells Tissues Organs 168(3): 126-36

[107] R.M. Tostões, S.B. Leite, J.P; Miranda, M. Sousa, D.I.Wang, M.J. Carrondo, P.M. Alves (2011) Perfusion of 3D encapsulated hepatocytes--a synergistic effect enhancing long-term functionality in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering 108(1): 41-9

[108] J.W. Allen, S.R. Khetani, S.N. Bhatia (2005) In vitro zonation and toxicity in a hepatocyte bioreactor. Toxicological Sciences 84(1): 110-9

[109] L. Shintu, R. Baudoin, V. Navratil, J.M. Prot, C. Pontoizeau, M. Defernez, B.J. Blaise, C. Domange, A.R. Péry, P. Toulhoat, C. Legallais, C. Brochot, E. Leclerc, M.E. Dumas (2012) Metabolomics-on-a-chip and predictive systems toxicology in microfluidic bioartificial organs. Analytical Chemistry 84(4): 1840-8.

[110] M. Hindié, M. Vayssade, M. Dufresne, S. Quéant, R. Warocquier-Clérout, G. Legeay, P. Vigneron, V. Olivier, J.-L. Duval, M.-D. Nagel (2006) Interactions of B16F10 melanoma cells aggregated on a cellulose substrate. Journal of Cellular Biochemistry 99: 96-104

ANNEXES

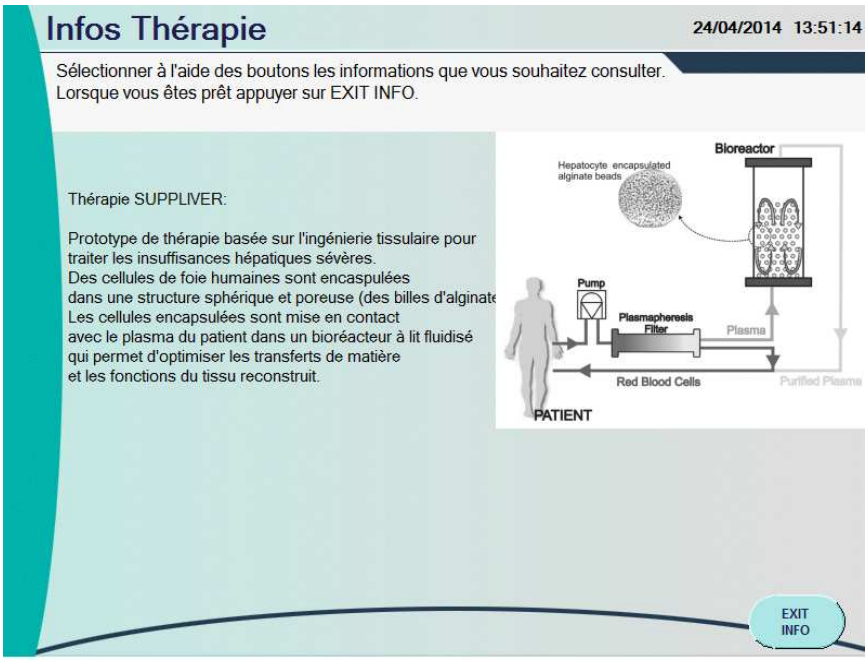
ANNEXE 1 : Calcul de la masse de microparticules de verre à ajouter à la solution d'alginate

Tableau Excel de calcul de la masse de microparticules à ajouter à la solution d'alginate

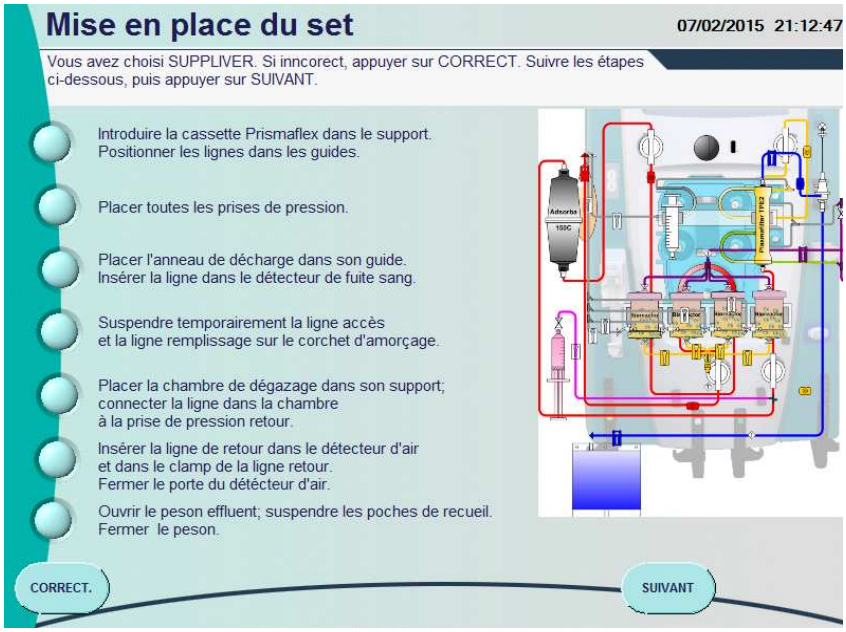
	B	C	D	E	F	G
1						
2	Column1	Column2	Column	Column4	Column	Column6
3	masse vol billes alginate 37°C	1015	kg.m-3			
4	masse vol plasma 37°C	1015	kg.m-3			
5	masse vol verre	2500	kg.m-3			
6	masse vol billes souhaitée	**1030**	**kg.m-3**			
7	rayon billes	450	microns			
8	rayon billles de verre	**10**	**microns**			
9	volume bille	3,8151E-10	m3	0,00038151	ml	(4/3)*((C6*10^-6)^3)*3,14
10	volume bille de verre	4,18667E-15	m3	4,18667E-09	ml	(4/3)*(C7*10^-6)^3*3,14
11	volume de billes de verre / billes	3,85364E-06	ml			(F8*(C5-C2))/(C4-C2)
12	nombre de billes de verre /billes	920,4545455				(E8*(C5-C2))/(C4-C2)
13	volume d'alginate liquide	100	ml			
14	rétractation alginate lors de la fabrication	0,7	%			
15	porosité	0,7	%			
16	volume d'alginate billes	49	ml			C13*C14*C15
17	nombre de billes	128437,0003				C16/E9
18	volume de billes de verre	0,494949495	ml	4,94949E-07	m-3	C17*C12*E10
19	masse de billes de verre	**1,237373737**	**g**			**E18*C5*10^3**
20	pourcentage de billes à ajouter vol/vol	0,494949495	%			(C18/C13)*100

ANNEXE 2 : Captures d’écrans de la thérapie SUPPLIVER

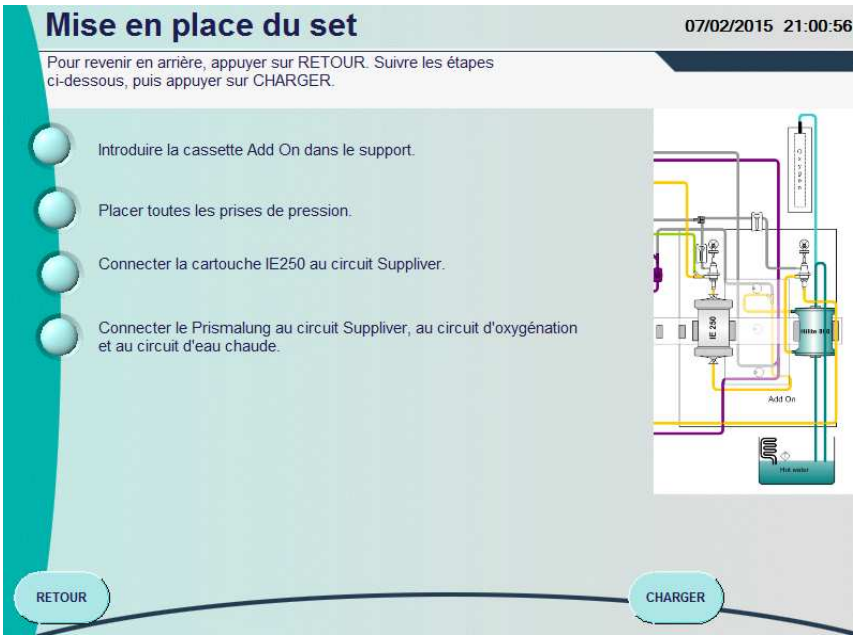
Capture de l’écran d'accueil de la thérapie SUPPLIVER



Capture d’écran de la présentation de la thérapie SUPPLIVER

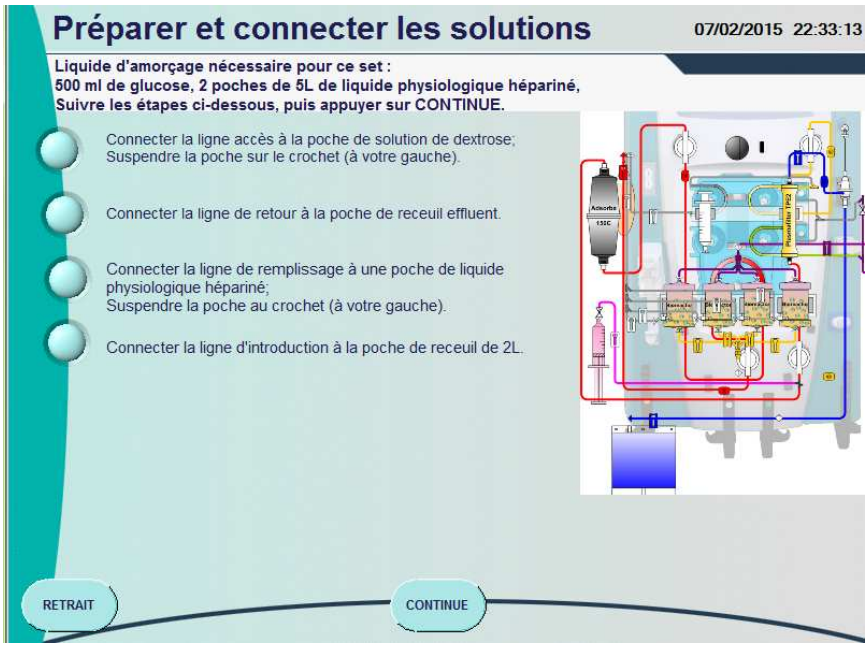


Capture d'écran de la mise en place du circuit côté Prismaflex

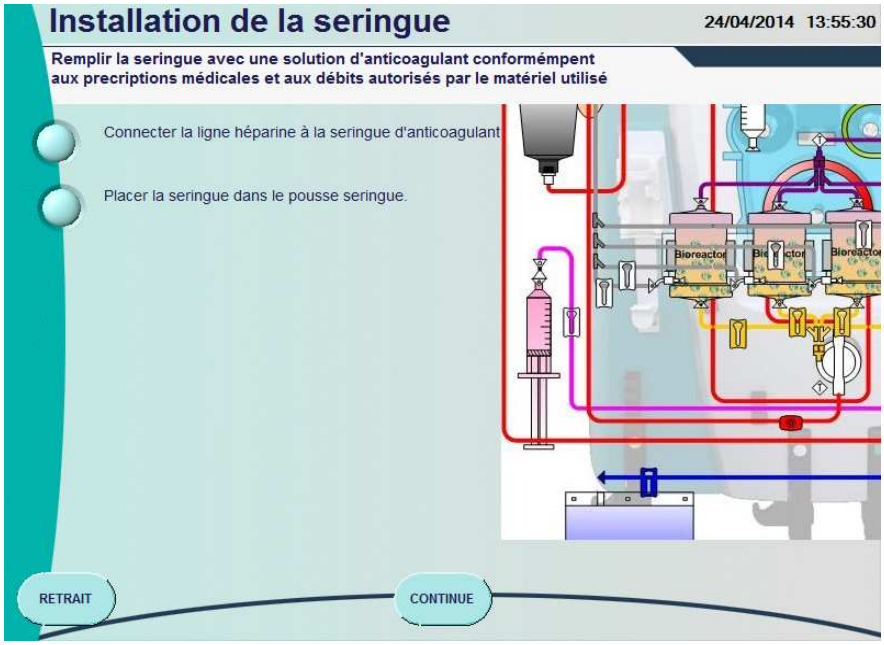


Capture d'écran de la mise en place du circuit côté Add-On

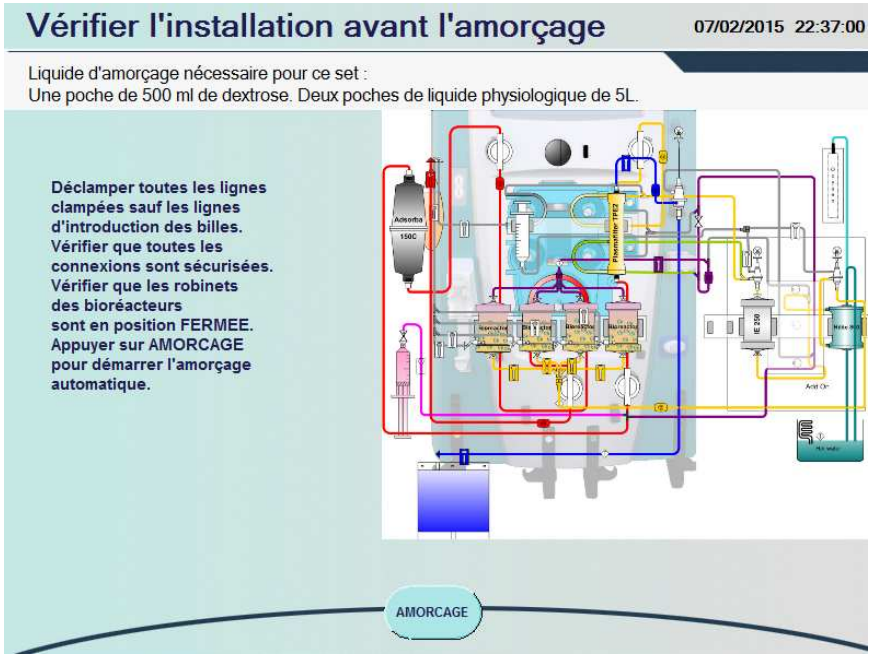
Capture d'écran du chargement du circuit



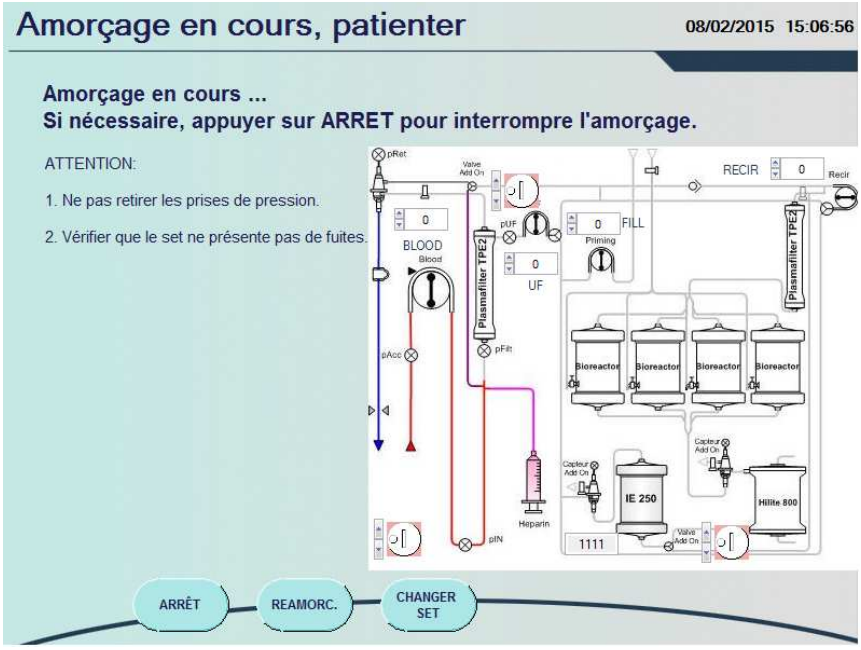
Capture d'écran des instructions données pour l'amorçage au liquide physiologique



Capture d'écran des instructions données pour l'anticoagulation

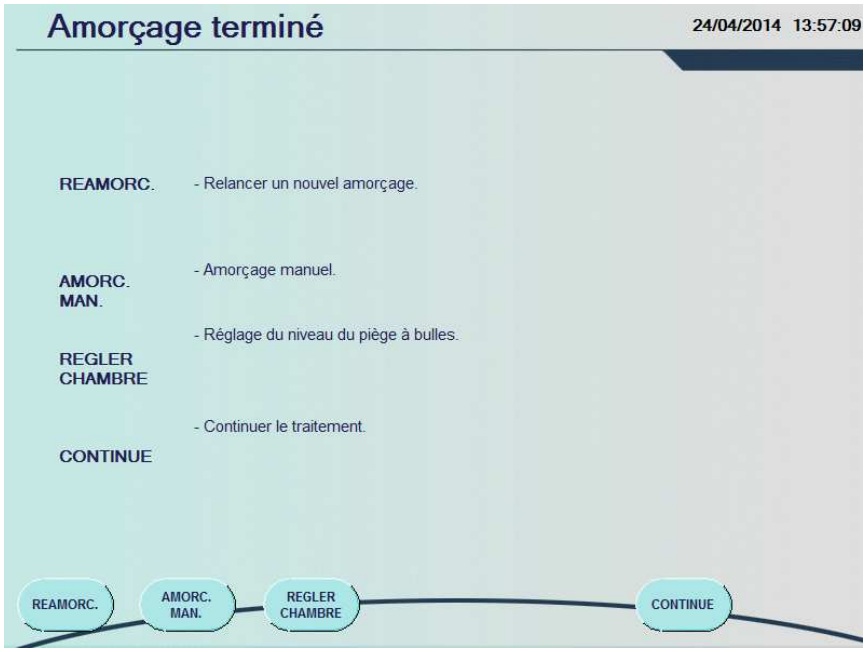


Capture d'écran de la vérification avant amorçage au liquide physiologique

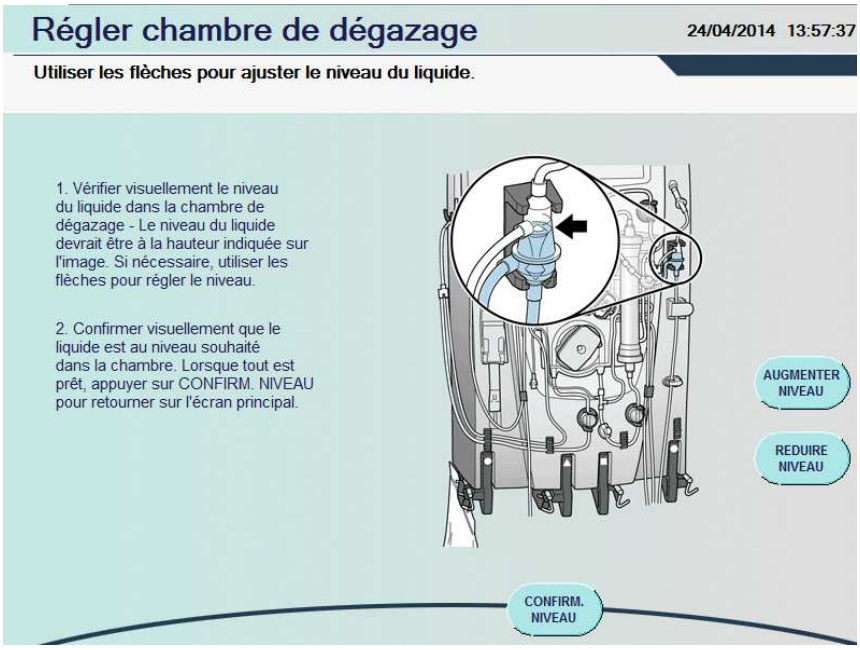


Capture d'écran de l'amorçage au liquide physiologique

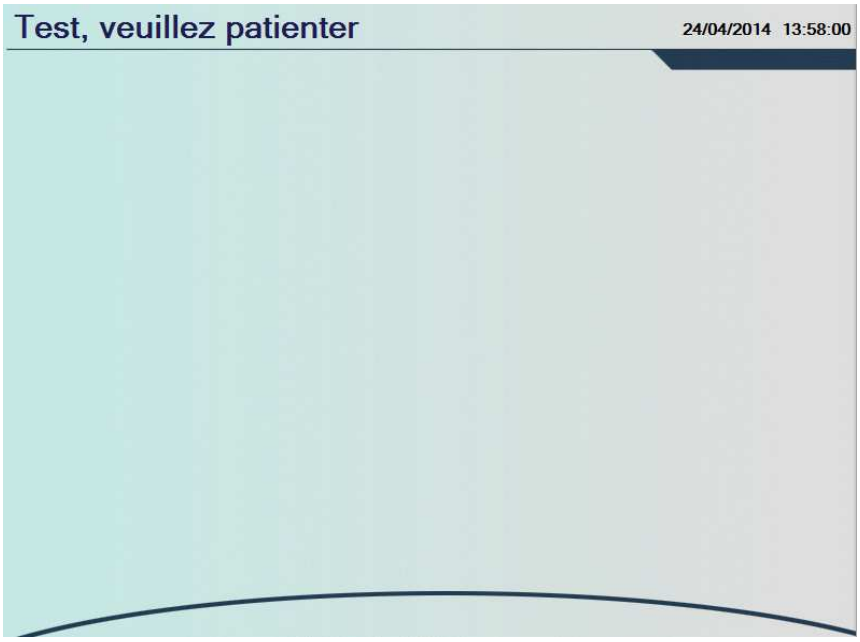
.



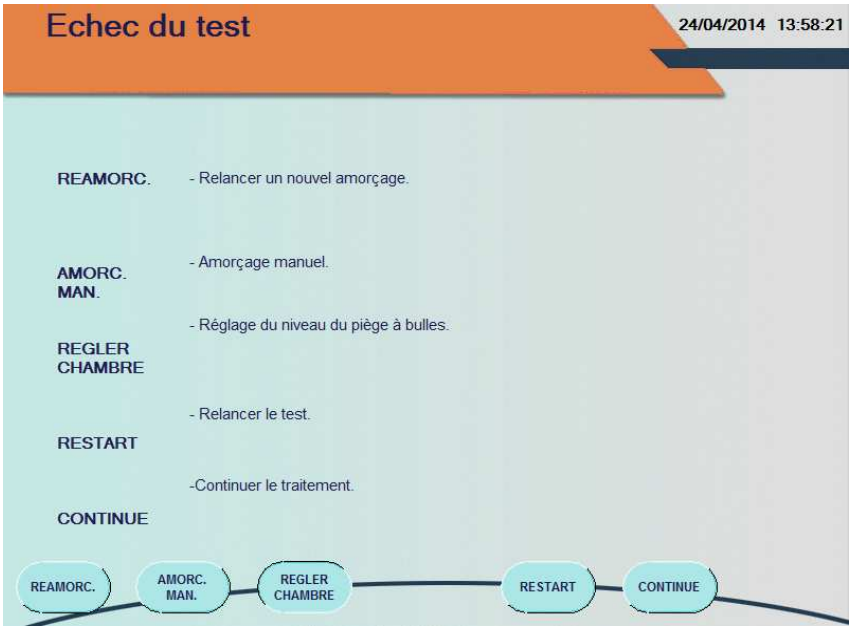
Capture d'écran de l'amorçage au liquide physiologique terminé



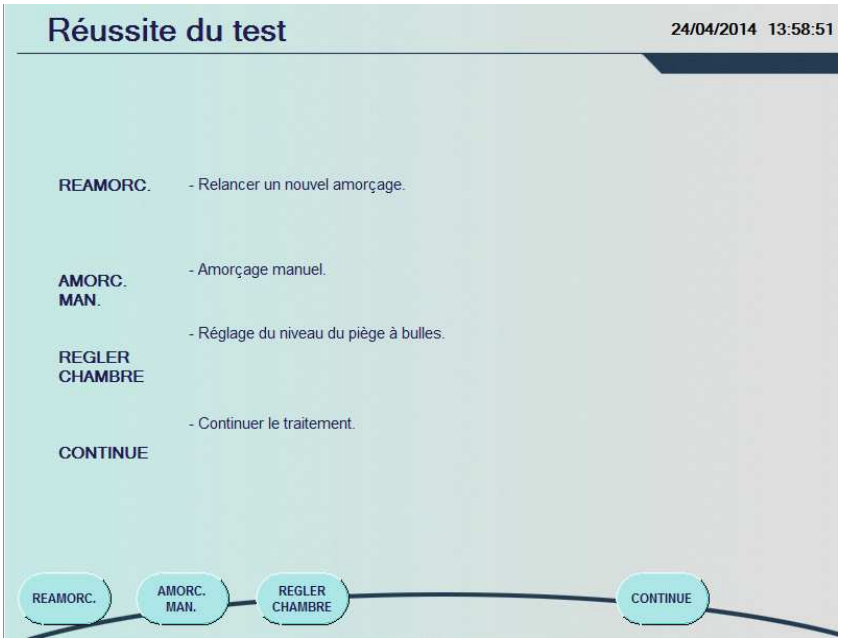
Capture d'écran du réglage du piège à bulles Prismaflex



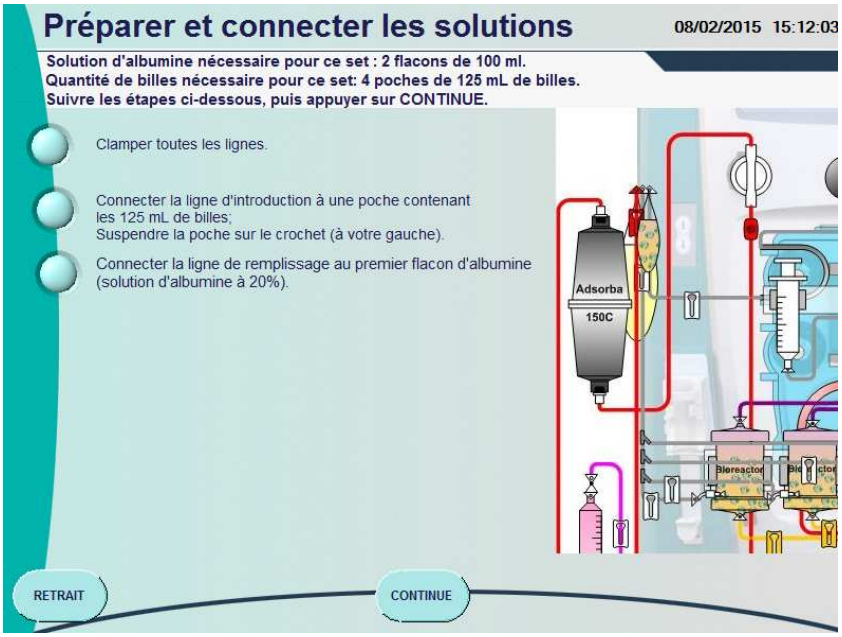
Capture d'écran du test de priming



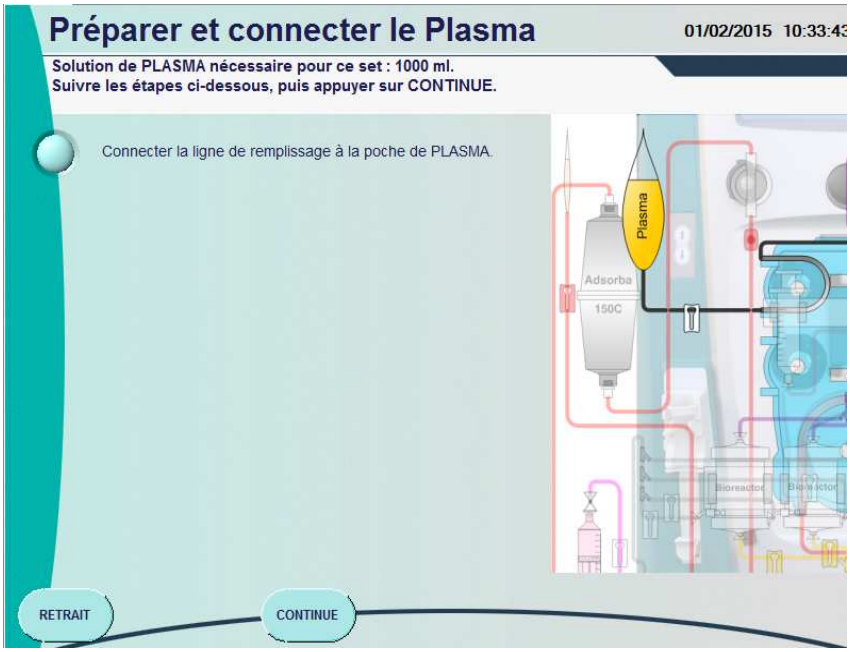
Capture d'écran d'un échec du test de priming



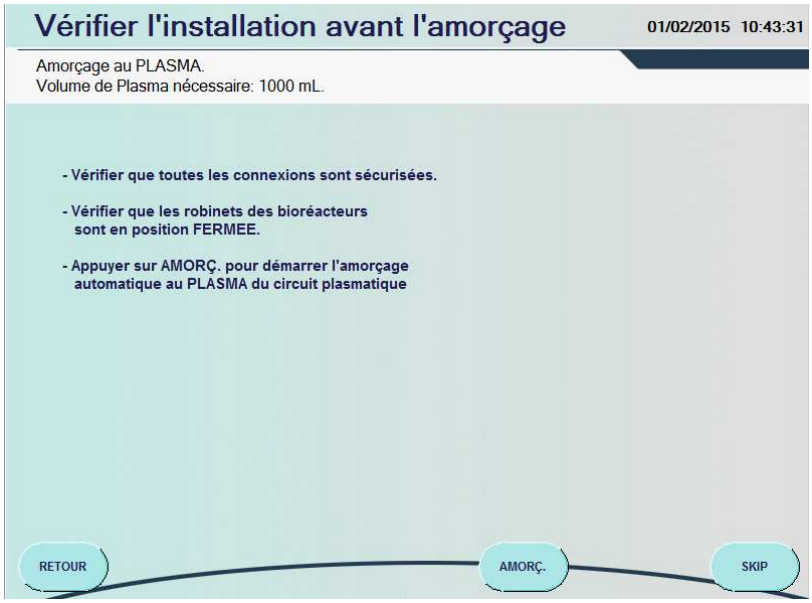
Capture d'écran d'une réussite du test de priming



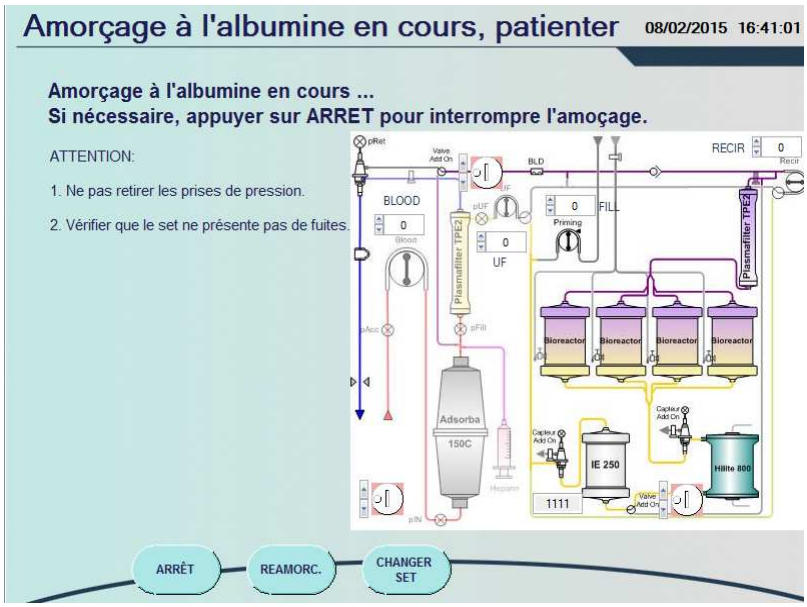
Capture d'écran des instructions données pour l'amorçage à l'albumine



Capture d'écran des instructions données pour l'amorçage au plasma



Capture d'écran de la vérification avant amorçage au plasma



Capture d'écran de l'amorçage à l'albumine

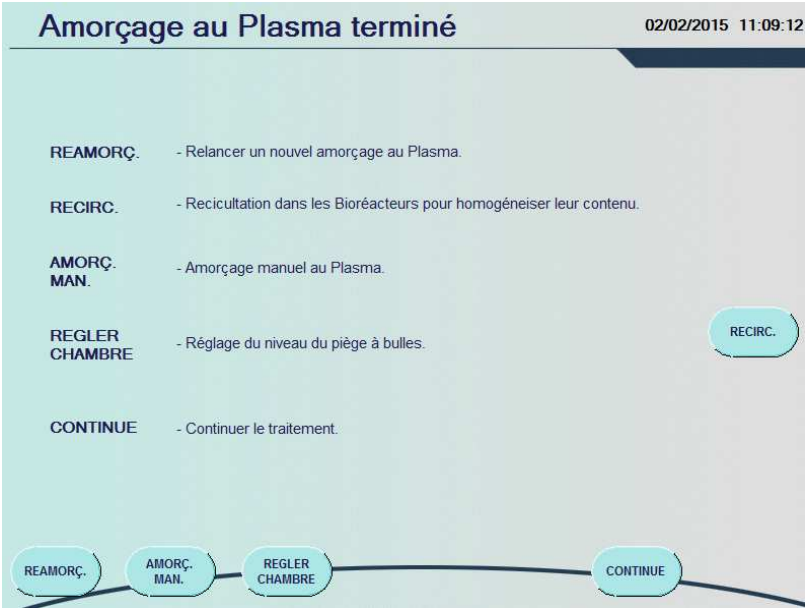


Figure 199: Capture d'écran de l'amorçage au plasma terminé

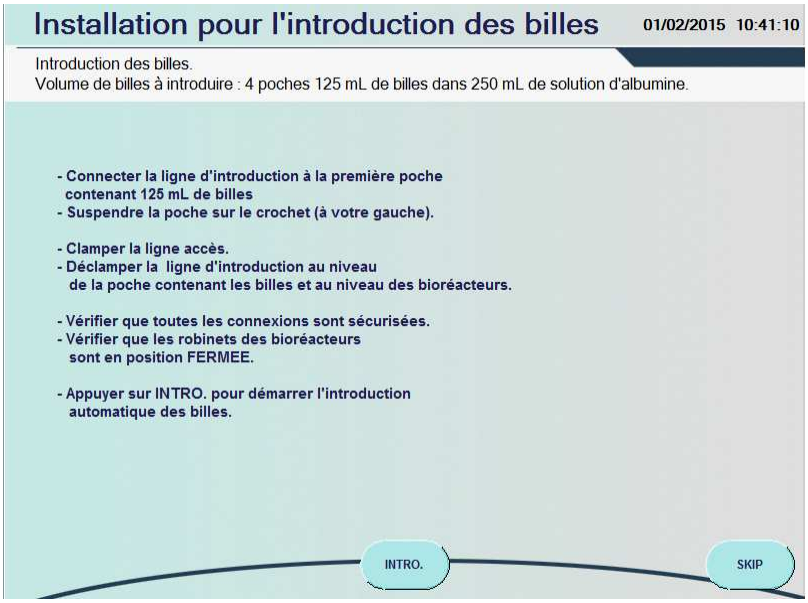


Figure 200: Capture d'écran des instructions données pour l'introduction des billes

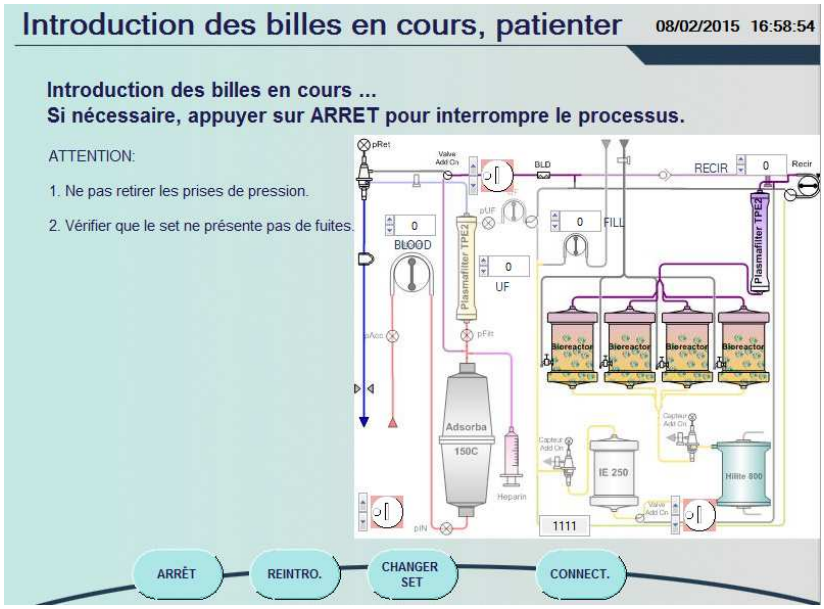


Figure 201: Capture d'écran de l'introduction des billes

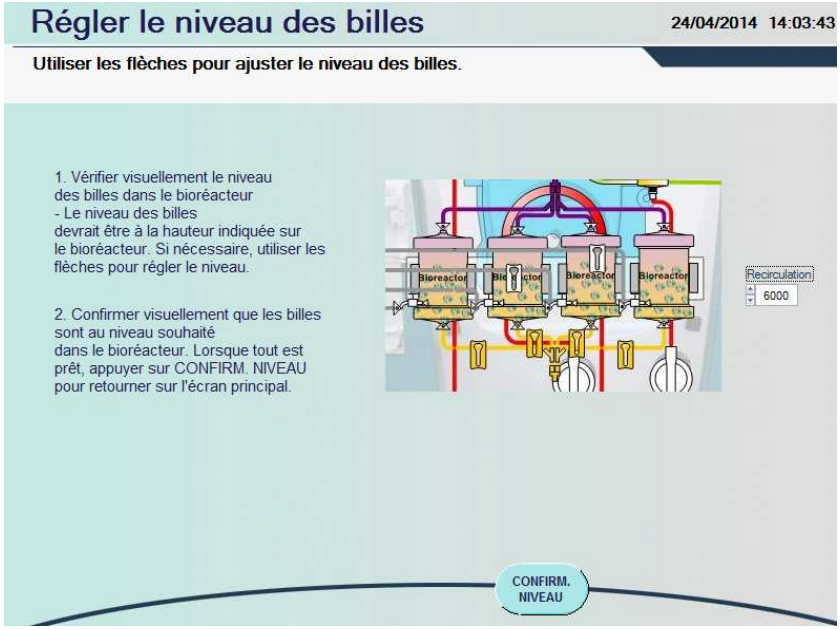


Figure 202: Capture d'écran du réglage du niveau des billes

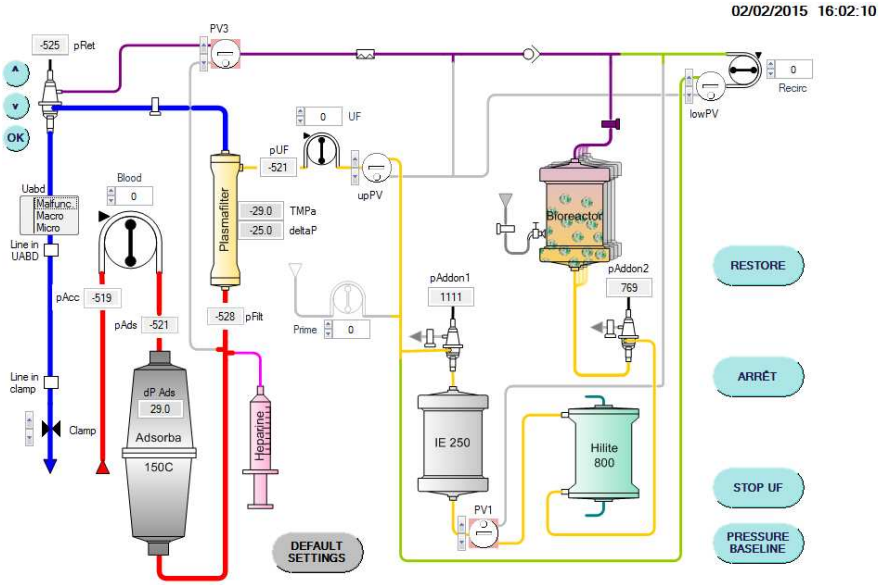


Figure 203: Capture d'écran du traitement

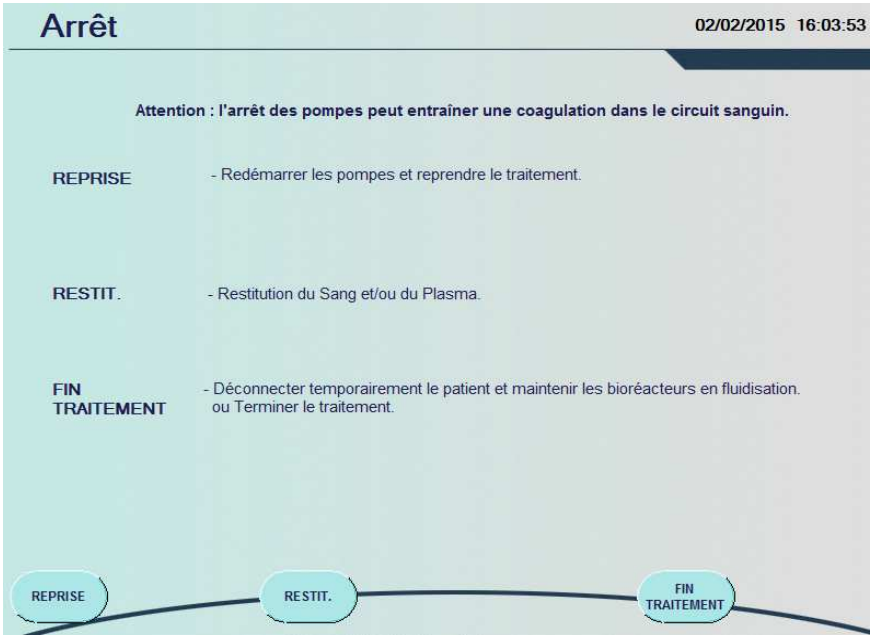


Figure 204: Capture d'écran de l'arrêt de la thérapie

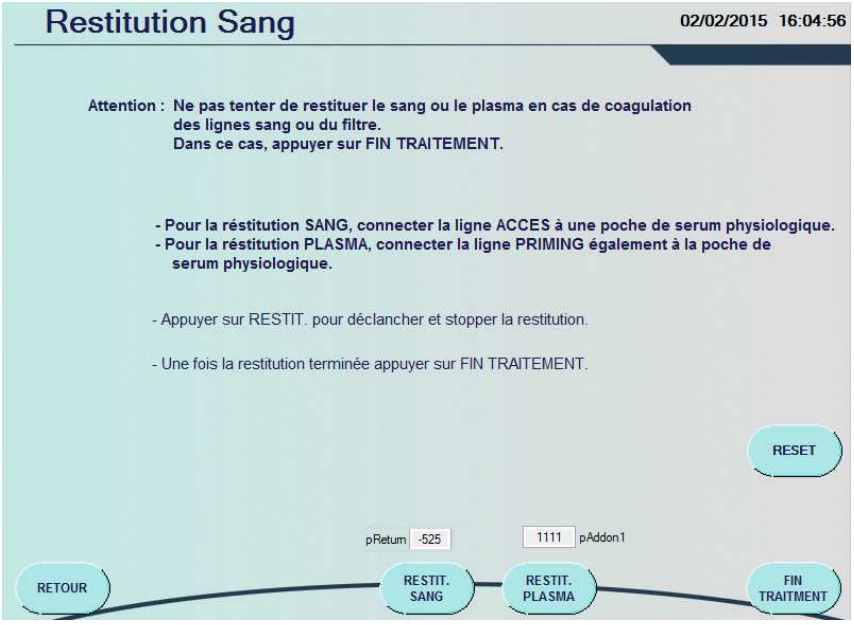


Figure 205: Capture d'écran de la restitution

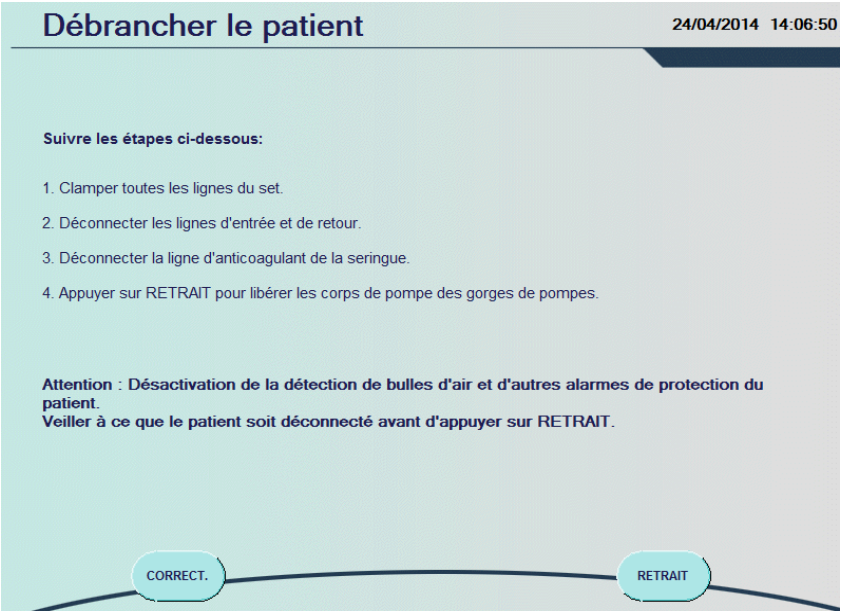
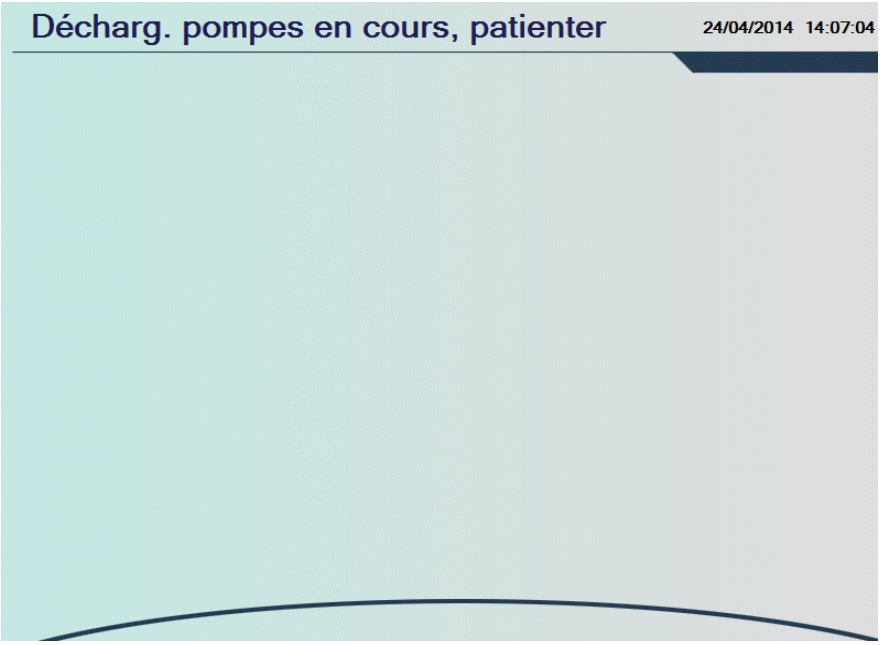
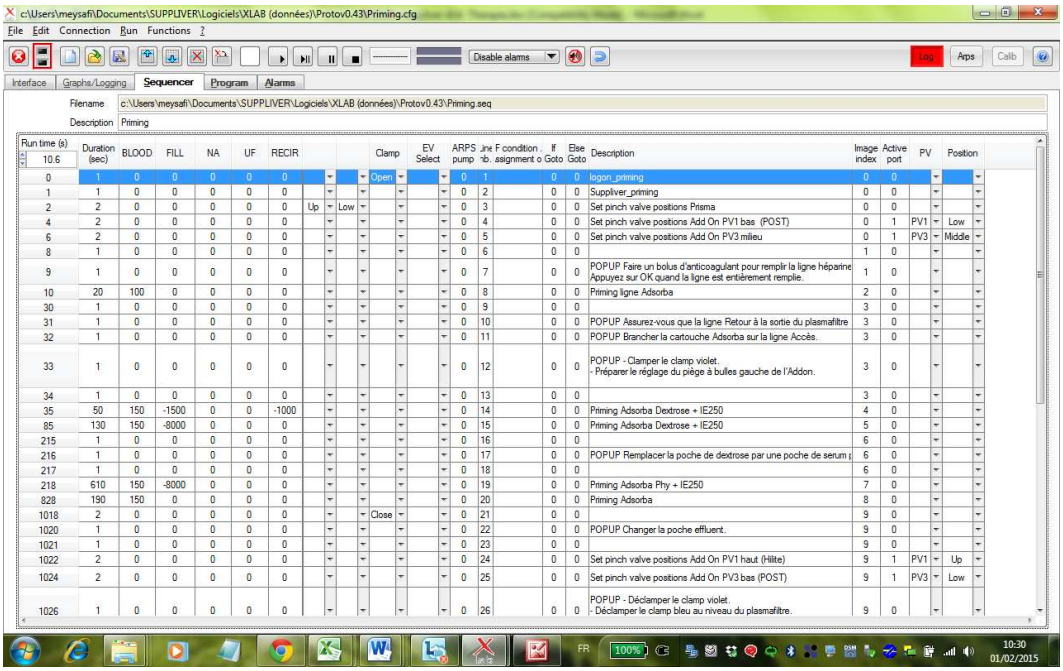


Figure 206: Capture: d'écran de la déconnexion du patient

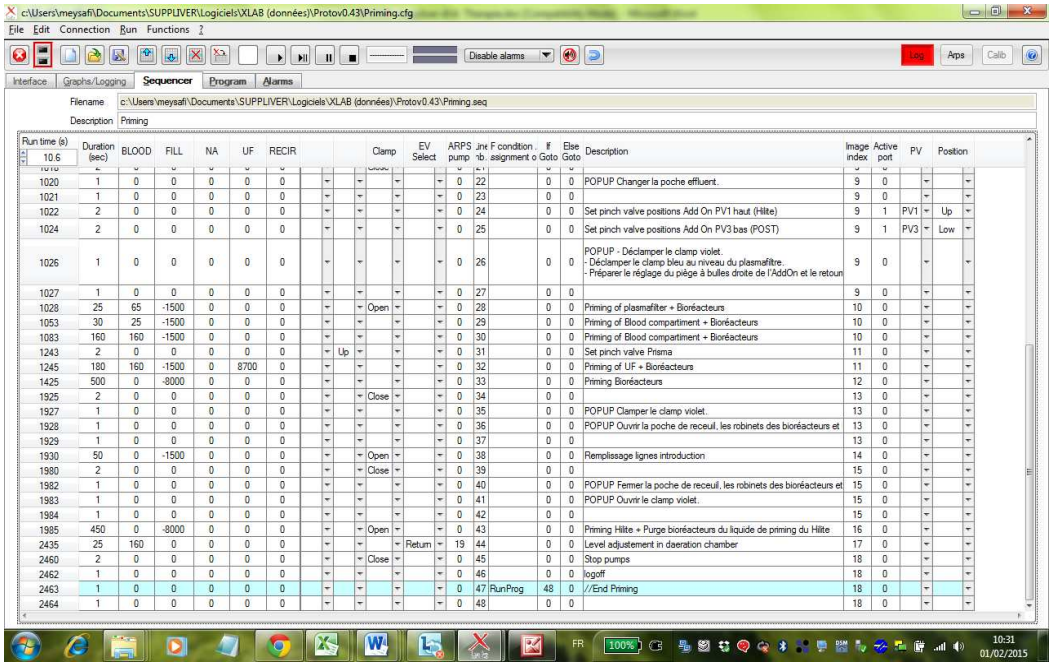


Capture: d'écran du déchargement des pompes

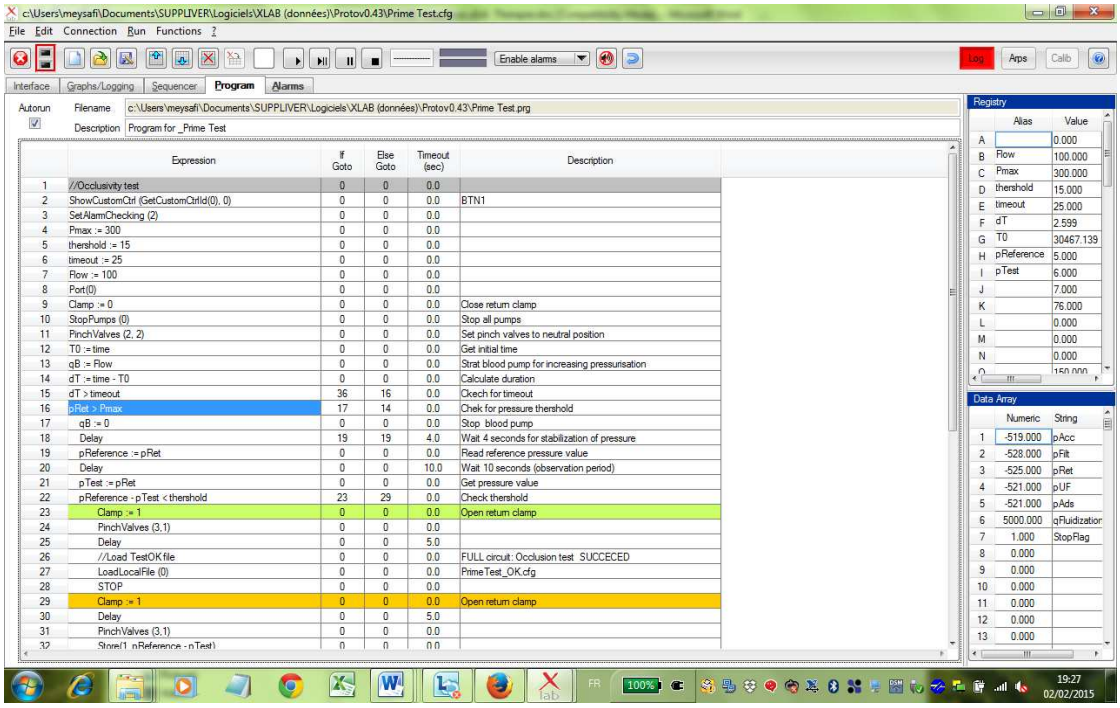
ANNEXE 3 : Séquences X-Lab de la thérapie SUPPLIVER



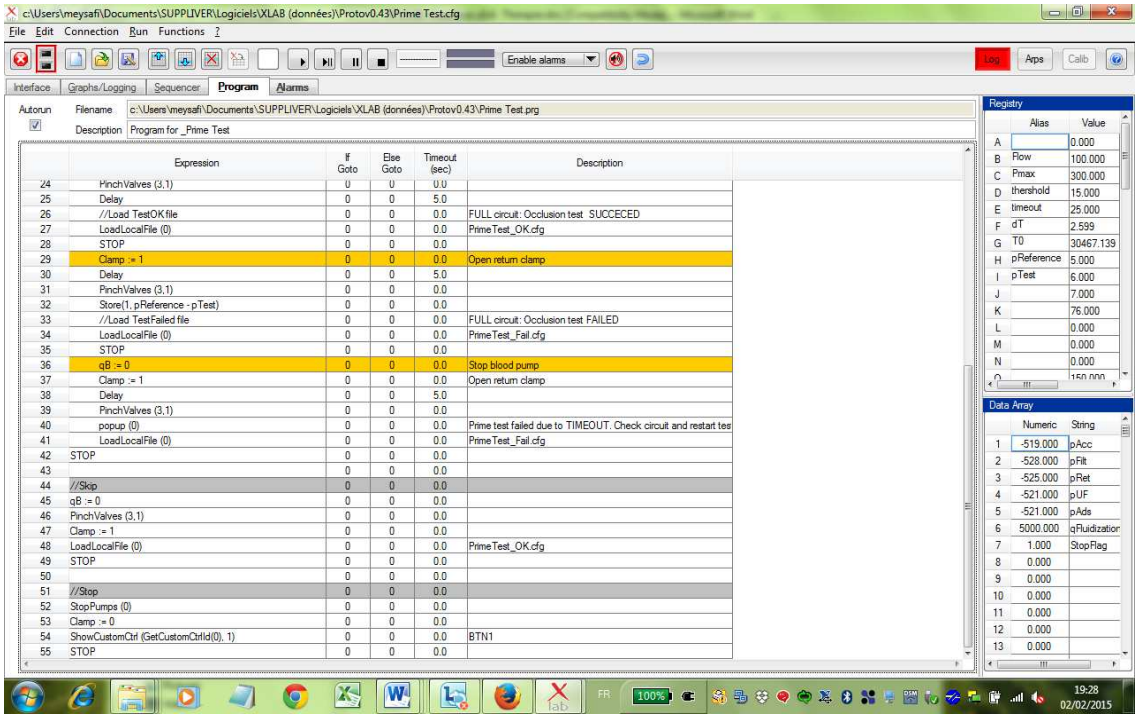
Capture d'écran de la séquence de priming au liquide physiologique (1)



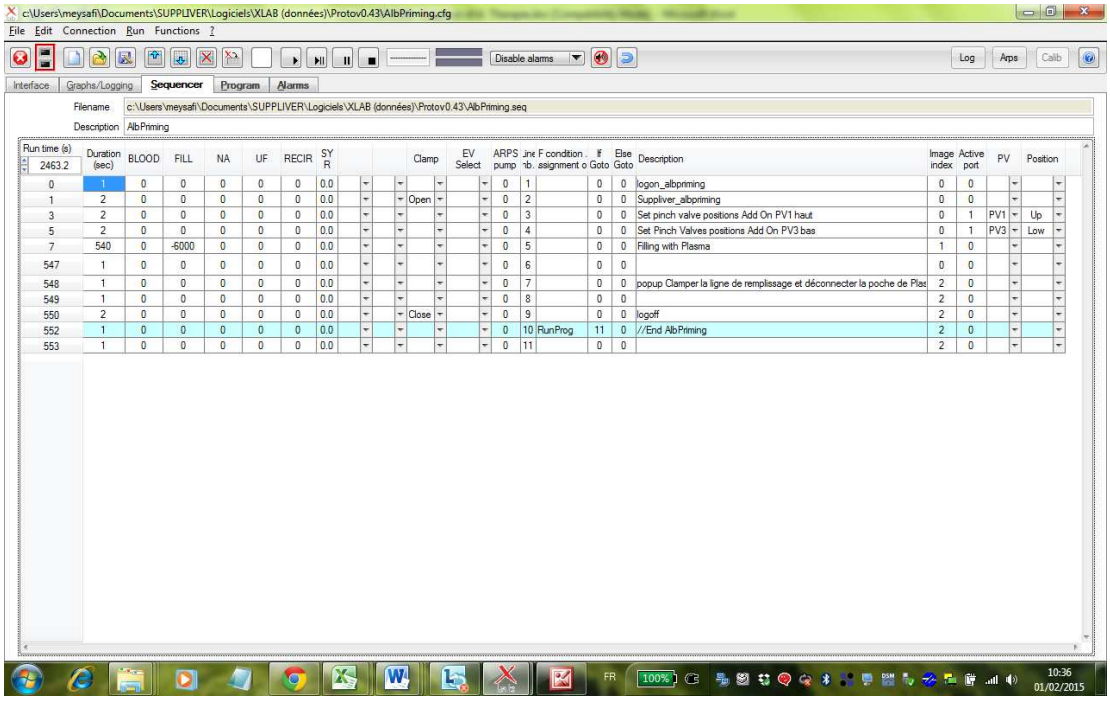
Capture d'écran de la séquence de priming au liquide physiologique (2)



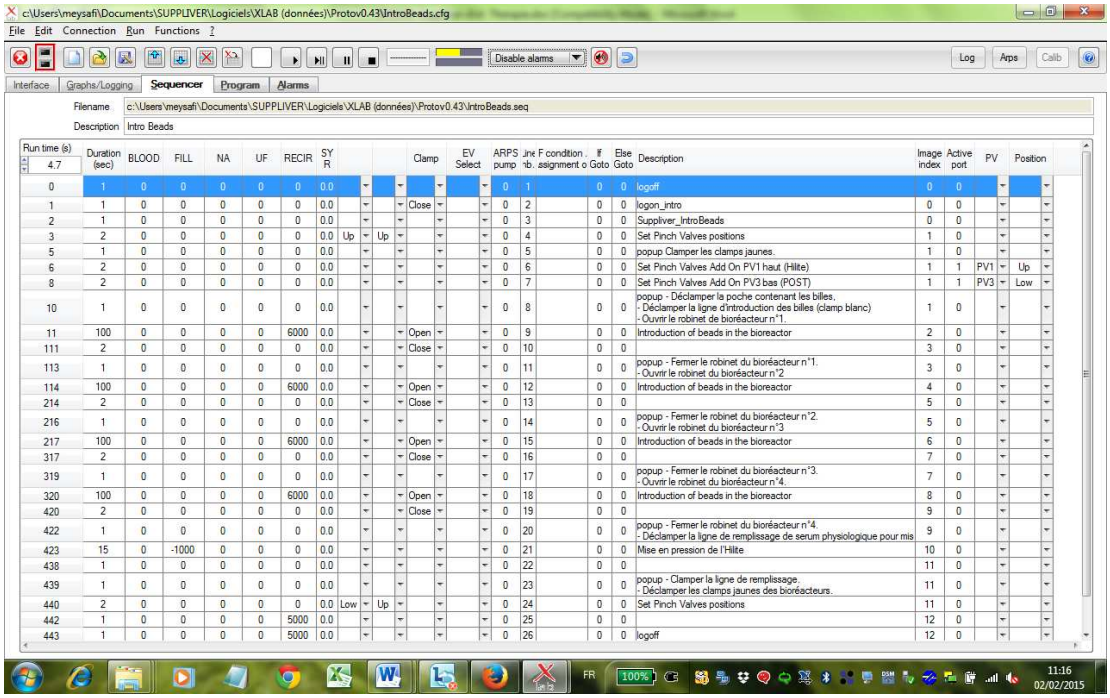
Capture d'écran de la séquence du test d'occlusivité (1)



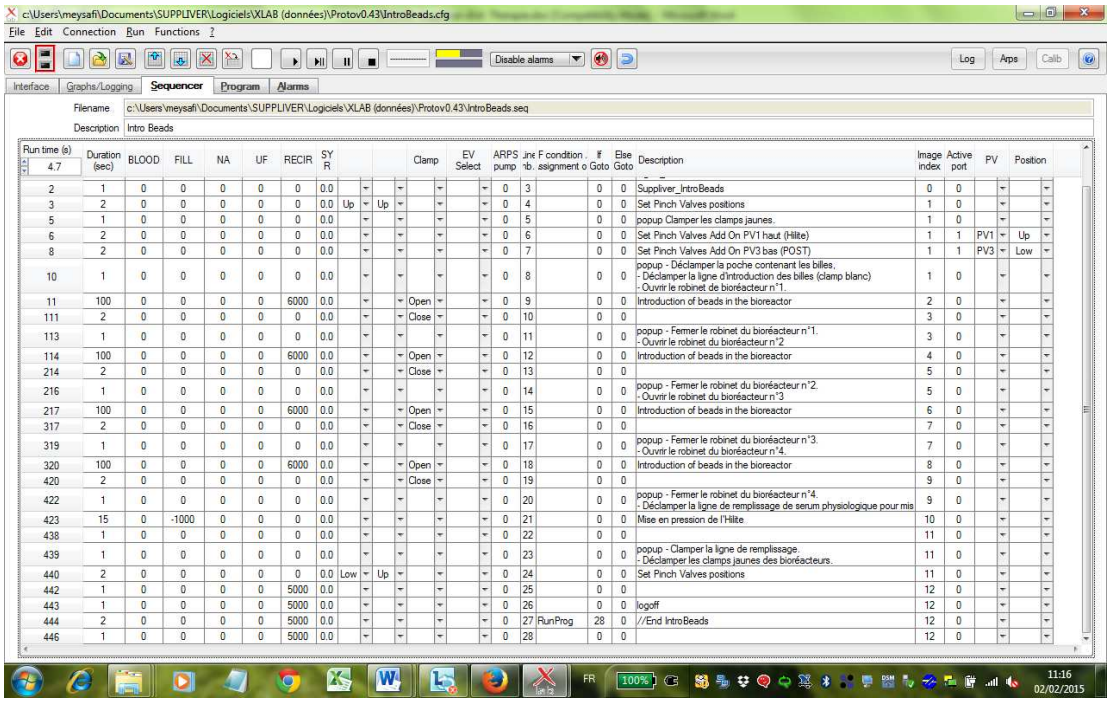
Capture d'écran de la séquence du test d'occlusivité (2)



Capture d'écran de la séquence de priming au plasma



Capture d'écran de la séquence d'introduction des billes (1)



Capture d'écran de la séquence d'introduction des billes (2)

ANNEXE 4: Article soumis pour le congrès IEEE EMBC

Development and validation of a bioartificial liver device with fluidized bed bioreactors hosting alginate-encapsulated hepatocyte spheroids *

S. Figaro[ab], U. Pereira[a], H. Rada[b], N. Semenzato[b], D. Pouchoulin[b] and C. Legallais[a]
[a] *UMR7338, Laboratory of Biomechanics and Bioengineering, Sorbonne universités, Université de Technologie de Compiègne, CNRS, Compiègne, France*
[b] *Gambro Industries, Research center, Meyzieu, France*

***Abstract*— Acute and acute-on-chronic liver failure are associated to high mortality when transplantation is not possible. The lack of donors has resulted in an important demand for liver support devices. This paper describes the design and validation of a new bioartificial liver (BAL) device including fluidized bed bioreactors hosting alginate-encapsulated hepatocytes spheroids. To ensure the efficacy of the BAL and the safety of the patients, a complex extracorporeal circulation was designed to be compatible with a commercial medical device, the Prismaflex® monitor, already used in intensive care units. Preclinical studies on large animal show that the treatment was well tolerated in terms of hemodynamics considerations. A method using non adhesive coating in petri dish led to the production of large amount of viable spheroids *in vitro* that were further encapsulated to follow up bioartificial liver activity during four days.**

I. Introduction

The liver is one of the most complex organs in the human body for anatomical, circulatory and essentially functional reasons. This organ plays a crucial role in the proper homeostasis of the human body. It provides three main functions: detoxification, storage and synthesis function.

The World Health Organization estimates that over 650 million people worldwide are affected by some form of liver disease. Among them, acute liver failure (ALF) is associated to a very high mortality above 70%. The rapid loss of liver functions can occur in patients with non-pre-existing liver disease or in patients already suffering from liver chronic insufficiency (acute-on-chronic liver failure) [1].

The causes of ALF differ according to the geopolitical position of the patients. Performance of health systems has allowed control, in some countries, of viral hepatitis. In these countries such as the United States or the United Kingdom, ALF are extensively drug-induced [2].

*Research supported by the French National Agency.
Cécile Legallais, Université de Technologie de Compiègne, Rue du Docteur Schweitzer, 60200 Compiègne, France (e-mail : cecile.legallais@utc.fr)
Dominique Pouchoulin, Gambro Industries, 7 avenue Lionel Terray, 69330 Meyzieu, France (e-mail : dominique_pouchoulin@baxter.com)

ALF is associated to a rise of numerous endogenous substances such as bilirubin, ammonia, lactate, aromatic amino acids, free fatty acids, phenols, mercaptans, benzodiazepines and pro-inflammatory cytokines [3]. Moreover the accumulation of toxins leads to hepatocellular necrosis and apoptosis.

In the short term, patients undergo treatments to stabilize their condition and monitor the disease (hemodynamic monitoring, administration of glucose, antibiotics, measuring of intracranial pressure...). However, nowadays the only effective treatment for the long term severe liver failure remains transplantation. A shortage of donors currently makes the number of transplantation lower than the clinical needs. Patients on the waiting list are more and more numerous. In France, 6-7% died on the waiting list [4]. The liver transplantation has also a relatively high mortality of 30-40% at 5-8 years and patients need a costly immunosuppression treatment for life.

Artificial liver substitution was born from the evolution of systems used for renal support. The kidney, which has an essentially filtering role, has been pretty well mimicked by artificial device. The systems have gradually evolved to meet the specific needs of detoxifying liver substitute. Two devices are currently used in clinics: the MARS® system from Gambro and the Prometheus® device from Fresenius Medical Care. They have proven their efficacy for the detoxification of some molecules such as bilirubin and ammonia [5] [6]. However all of the functions of a healthy liver could not be supplied by only artificial components.

BALs can be considered as the future of liver support because they include hepatocytes cultured in bioreactors. A major limitation of these technologies is to get enough functional cells to be able to really supply the liver. It is commonly acknowledged that at least 10 to 20 billion hepatocytes are needed in a bioartificial extracorporeal circulation so as to be demonstrably effective [7].

To ensure high functionality of hepatocytes, three-dimensional cultures have been developed. Culture of spheroids has become a simple and effective method to improve cell-cell interactions [8].

Preprint submitted to 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Received April 14, 2015.

However the inclusion of biological elements in extracorporeal circulations is synonymous with many challenges: a suitable environment has to be created by artificial devices (oxygenation, heating, pre-detoxifications...) to promote cells' efficiency [9].

II. Design of a Bioartificial Liver Device

To develop the bioartificel liver device, the choice was made to adapt a plasmapheresis set from the Prismaflex™ (Gambro) device, placing the bioreactor on a plasma extraction line in a closed secondary loop. The same components were used (lines, bubble trap, sensors...) and positioned in a rather similar way to that of a standard plasmapherisis circuit to ensure the correct circulation of fluids and the patient safety.

Changes were applied to the classical plasmapheresis circuit in order to meet the specifications of the BAL therapy. These specifications have three main goals: to integrate the bioreactor in the extracorporeal circulation, to ensure optimal functionality of the cells (maintaining a temperature 37 ° C in the bioreactors, oxygenating the medium...) and to ensure patient safety.
The developed circulation is thus composed of a plasmafilter, four bioreactors in parallel, an oxygenator / heater (Prismalung™, Gambro), artificial detoxifying elements (an activated carbon cartridge Adsorba™ and an ion exchange cartridge IE250™), a syringe pump for anticoagulation and a particle filter. The simplified circuit is shown in Fig.1.

To implement the Suppliver therapy, an investigational software developed by Gambro was used. It can control any machine functions and it allows to design customized therapy modalities. In addition, the user interface mimics the machine interface for a realistic visualization of the steps of the newly established therapy. A complete extracorporeal circulation of more than 1 liter was manufactured for low-weight patients; however, it is easily adaptable to adult size.

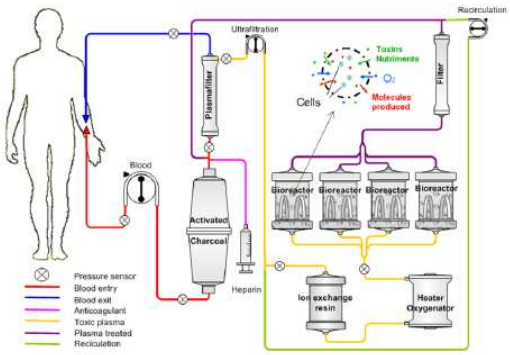


Figure 1. Schematic of the extracorporeal circulation

A control system was also developed to ensure the security and the well-functioning of the extracorporeal circulation (monitoring of pressures, flows, detection of leaks…). The system continuously checks by user-defined alarms the normal follow-up of the procedure. If needed, a colored banner, a beep and a message indicate that an alarm has been triggered.

III. Production of Encapsulated Hepatocyte Spheroids

C3A cells (ATCC, CRL 10-471) were used to validate the production process. More than two billions cells have to be collected to fill one bioreactor. Cell culture was achieved in three steps in Minimum Essentials Medium Earls salts (MEM) culture media (supplemented with 10% SVF and 1% with streptomycin, Hepes, stable L-glutamine, pyruvate, non-essential amino acids from Gibco): static culture in flask, dynamic culture in petri dish to form spheroids and dynamic culture of encapsulated hepatocyte spheroids in Spinner flasks (Fig.2).

The static culture was performed using Nunc ™ Easy fill ™ Cell Factory ™ systems. After one week of culture, cells were at more than 80% of confluence. Cell dissociation was performed with trypsin in order to create a cell suspension.

The spheroids were formed in petri dishes coated with a siliconizing reagent (Sigmacote from Sigma Aldrich) to avoid adherence [10]. Agitation at 45 rpm was applied with an orbital shaker (Edmond Buhler). After two days of culture, spheroids were formed. Their sizes range from 50 to 100 micrometers.

Spheroids were then encapsulated in alginate (Manucol LKX from FMC BioPolymer) at 1.5% sterilized by successive filtrations. The encapsulation was performed with a home-made system based on a coaxial air flow extrusion [11]. Cells were added to the alginate solution at a concentration of 20 million cells per milliliter.

Just after encapsulation, beads were cultured overnight under stirred conditions within spinner flasks. The magnetic stirrer rotated at 100 rpm to get a gentle motion of all beads.

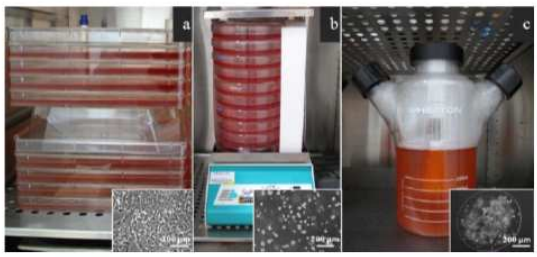


Figure 2. Cell culture steps for production of encapsulated hepatocyte spheroids: Static culture in flasks (a), dynamic culture in petri dishes to form spheroids (b) and dymanic culture of encapsulated hepatocytes spheroids in a Spinner (c).

Preprint submitted to 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Received April 14, 2015.

IV. Preclinical Validation of the Extracorporeal Circulation

A protocol involving the whole setup without cells on sheeps was defined with the opportunity to generate preliminary data monitoring. These data were useful to determine the relevance to include or not in the treatment circuit's priming with plasma, instead of saline solution, to prevent high hemodilution consequences.

The chosen preclinical model is commonly used by Gambro for validation tests in relation to the coagulation of hemodialysis circuits. Tests were performed on awaked sheeps from Veterinary School of Vet'Agro Sup in Marcy l'Etoile. The internal jugular vein was selected as vascular access. Anticoagulation with heparin was managed by activated clotting time (ACT) measurements. In this protocol, two sheeps of about 80 kg were tested on two non-consecutive days. On the one day, the treatment was done with priming with saline solution and on the other day with autologous plasma. Treatments were similarly set up for all animals and lasted 4 hours (except in one case because a coagulation has occurred). Blood return was achieved in all cases and plasma return only when saline solution was used for priming. Mean arterial pressure was monitored during the entire the procedure.

To compare the different solutions for priming, one indicator has been used: the percentage of plasmadilution. Plasmadilution was calculated by the difference between the initial concentration of protein ($[P]_i$) and the protein concentration at equilibrium ($[P]_e$) (equilibrium is reached when the concentration of proteins in the circuit and in the animal blood are the same) (1) or after the restitution of the extracorporeal blood and plasma if needed ($[P]_f$) (2). These differences are normalized to the initial concentration of proteins of the animal. Plasmadilution is expressed as a percentage.

$$\text{Plasmadilution in treatment} = ([P]_i - [P]_e)*100 / [P]_i \quad (1)$$

$$\text{Plasmadilution after restitution} = ([P]_i - [P]_f)*100 / [P]_i \quad (2)$$

No side effects were observed. The mean arterial pressure remained stable during treatments. The plasmadilution was much larger after priming with saline solution than with autologous plasma (respectively 20.4 (±3.6) % and 5.7 (±4.5) %) (Fig.3). 20% plasmadilution was expected in the case of priming with saline solution since about 7L blood was diluted with about 1.5L of extracorporeal circulation solution.

Returning the plasma, in the case of priming with saline solution, has little effect. The return of blood tends to increase the rate of hemodilution during treatment with plasma priming. This can be explained by the fact that too much saline solution was infused during the restitution of blood and this may partly justify the non-effectiveness of the return of the plasma during treatment with a priming with saline solution.

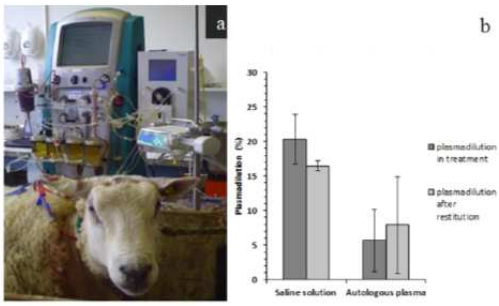


Figure 3. Results of preclinical experimentations: The treatment is well tolareted by sheeps (a) and hemodilution results for the two types of treatments (b).

V. *In Vitro* Validation of the Fluidized Bed Bioreactor

A complete extracorporeal circuit equipped with only one bioreactor was loaded with a volume of 150ml of beads hosting C3A spheroids. The encapsulated cells (bead diameter 800 µm) were cultured under fluidized bed conditions during four days in MEM culture media. Live cells were stained in blue by Hoechst and dead cells were stained in red by Propidium Iodure. Very good viability was observed, proving the ability of the set up to keep cells in proper conditions. The rare dead cells observed by confocal microscopy were located in the center of the beads (Fig. 4)

Oxygen supplementation was performed with the Prismalung device of Gambro. Just after the introduction of beads, oxygen concentration decreased from about 18mg/L to 14mg/L suggesting an important consumption of oxygen by the cells. The concentration of 14mg/ml was maintained during all of the experiment. Temperature was also kept at 37° inside the bioreactor through the Prismalung device.

Albumin and glucose concentrations in the bioreactor were followed during four days of culture. After one day, about 2.2 mg of human albumin were detected in the medium while about 1 g of glucose was consumed by the cells (Fig.5). The average rate of albumin production and glucose consumption were 67.78 (± 18.44) ng/10^6 cells/h and 31.17 (± 9. 24) µg/10^6 cells/h, respectively.

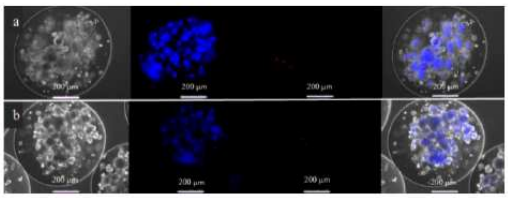


Figure 4. Observation by confocal miroscopy of the encapsulated hepatocyte spheroids before (a) and after 4 days of fluidisation (b). Live cells are stained in blue by Hoechst and dead cells are stained in red by Propidium Iodure.

Preprint submitted to 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Received April 14, 2015.

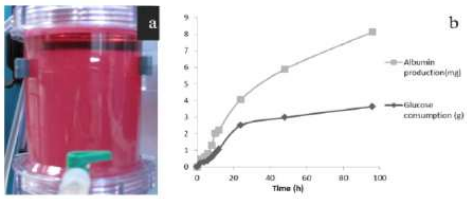


Figure 5. Beads hosting hepatocytes spheroids in fluidization in the bioreactor (a) and amounts of albumin producted and glucose consumed by the bioreactor (b)

VI. Discussion

In the preclinical study, hemodilution was not shown to affect hemodynamics in healthy sheeps. This is a very encouraging result since a large extracorporeal volume is necessary to run the secondary loop hosting the bioreactors. However, hemo- and plasmadilution would be less tolerated if the volume of extracorporeal circuit is increased further, or with non-healthy animals in acute liver failure models. Therefore, it is strongly suggested to prime the circuit with plasma or plasma equivalent in future preclinical trials as it was done with another team working with a fluidized bed bioreactor [12]. Our preliminary study showed that priming with plasma was not more complicated to implement. No problems occurred during the additional steps it generated.

The method of production of spheroids is simple and rapid. In fact, in less than three days, spheroids could be formed and encapsulated. The next step would be to switch the encapsulation process to a device specifically designed for large scale application [13].

Finally, the functionality and density of cells in the beads still need to be improved to lead to a better production of albumin regarding the consumption of glucose [14].

VII. Conclusion

A complete extracorporeal circulation was successfully designed for a new bioartificial liver device with fluidized bed bioreactors hosting alginate-encapsulated hepatocyte spheroids. Security management, with the control system developed, had allowed us to perform preclinical tests showing a very good tolerance of the animals towards the treatment. Results of preclinical trials tend to favor priming with an equivalent to plasma because hemodilution is highly minimized. In another hand, the *in vitro* validation, with a bioreactor filled with cells, proved the efficacy of the device regarding biological functions: spheroids within the beads were kept alive and metabolically active during four days, which is much longer than planned therapies for real treatments.

References

[1] R. Jalan, F. Saliba, M. Pavesi, A. Amoros, R. Moreau, P. Ginès, E. Levesque, F. Durand, P. Angeli, P. Caraceni, C. Hopf , C. Alessandria, E. Rodriguez, P. Solis-Muñoz, W Laleman, J. Trebicka, S. Zeuzem, T. Gustot, R. Mookerjee, L. Elkrief, G. Soriano, J. Cordoba, F. Morando, A. Gerbes, B. Agarwal ,D. Samuel, M. Bernardi, V. Arroyo, CANONIC study investigators of the EASL-CLIF Consortium "Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure" *Journal of hepatology*, vol. 61, pp. 1038-1047, November 2014.

[2] W. Bernal and J. Wendon, "Acute Liver Failure" *The New England Journal of Medicine,* vol. 369, pp. 2525-2534, December 2013.

[3] S. N. Bathia, U. J. Balis, M. L. Yarmush and M. Toner1 "Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: Cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells " *FASEB Journal,* vol. 13, pp. 1883-1900, November 1999.

[4] Agence de biomédecine. Bilan hépatique greffe 2013. http://www.agencebiomedecine.fr/annexes/bilan2013/donnees/organes/05-foie/pdf/hepatique.pdf

[5] K. Rafai, T. Ernst, U. Kretschmer, M.J. Barh, A. Scheinder, C. Hafer, H. Haller, M.P. Manns, D. Fliser "Prometheus –a new extracorporeal system for the treatment of liver failure", *Journal of hepatology*, vol. 39, pp. 984-990, August 2003.

[6] J. Stange S.R. Mitzner, T. Risler, C.M. Erley, W. Lauchart , H. Goehl , S. Klammt , P. Peszynski , J. Freytag , H. Hickstein , M. Löhr , S. Liebe , W. Schareck , U.T. Hopt , R. Schmidt "Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS): Clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support" *Artificial Organs*, vol. 23, pp. 319-330, April 1999.

[7] R. Chalumeau, P. Poyck and M.P. van de Kerkhove, "Bioartificial liver: its pros and cons" *Therapeutic Apheresis and Dialysis,* vol. 10, pp. 168-174, April 2006.

[8] K. Wrzesinski, A. Rogowska-Wrzesinska, R. Kanlaya, K. Borkowski, V. Schwämmle, J. Dai, K.E. Joensen, K. Wojdyla, V.B. Carvalho, S.J. Fey "The cultural divide: exponential growth in classical 2D and metabolic equilibrium in 3D environments" *Plos one*, vol. 9, September 2014.

[9] B. Struecker, N. Raschzok & I. M. Sauer "Liver support strategies: cutting-edge technologies" *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,* vol. 11, pp. 166–176, October 2013.

[10] S. Figaro, b, U. Pereira A-S. Dumé, H. Rada, S. Capone, d A. Bengrine, A. Baze, E. Rabenirina, N. Semenzato, Y-E. Herpe, J. Faivre M. Dufresne, L. Richert, G. Duverlie, M. Daujat-Chavanieu, F. Saliba, D. Pouchoulin, C. Legallais "SUPPLIVER: Bioartificial supply for liver failure" *IRBM*, vol. 36, pp. 101-109, March 2015.

[11] A. Gautier, B. Carpentier, M. Dufresne, Q. Vu Dinh, P. Paullier and C. Legallais, "Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and the metabolic activities of encapsulated c3a cells in bioartificial liver applications" *European Cells and Materials*, vol. 21, pp. 94-106, January 2011

[12] C. Selden, C. W. Spearman, D. Kahn, M. Miller, A. Figaji, E. Erro, J. Bundy, I. Massie, S. Chalmers, S. Arendse, A. Gautier, P. Sharratt, B. Fuller, H. Hodgson, "Evaluation of encapsulated liver cell spheroids in a fluidised-bed bioartificial liver for treatment of ischaemic acute liver failure in pigs in a translational setting" *Plos one*, vol. 8, December 2013.

[13] M. B. McIntosh, S. M. Corner, B. P. Amiot, S. L. Nyberg, "Engineering analysis and development of the spheroid reservoir bioartificial liver" *Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 5985-5988, September 2009. Annual International Conference of the IEEE.

[14] J. M. Millis, D. C. Cronin, R Johnson, H. Conjeevaram, C. Conlin, S. Trevino, P. Maguire, "Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact" *Transplantation*, vol. 74, pp.1735-1746, December 2002.

Preprint submitted to 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Received April 14, 2015.